

UNIVERSITÉ DE PARIS

FACULTÉ DE PHARMACIE

SÉRIE U, N° 23.

BIOLOGIE ET CHROMOGÉNÈSE

CHEZ

DEUX BACTÉRIES NOUVELLES

du Genre SERRATIA

THÈSE

POUR L'OBTENTION DU DIPLÔME DE

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

(PHARMACIE)

Présentée et soutenue le Février 1939

PAR

Albert JAN
Pharmacien

JURY { MM. LUTZ, *Président.*
BACH, *Professeur.*
RÉGNIER, *Chargé de Cours.*

RENNES
SOCIÉTÉ ANONYME DES IMPRIMERIES OBERTHUR

1939



Digitized by the Internet Archive
in 2026

UNIVERSITÉ DE PARIS

FACULTÉ DE PHARMACIE

SÉRIE U, N° 23.

BIOLOGIE ET CHROMOGÉNÈSE

CHEZ

DEUX BACTÉRIES NOUVELLES

du Genre SERRATIA

THÈSE

POUR L'OBTENTION DU DIPLÔME DE

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

(PHARMACIE)

Présentée et soutenue le Février 1939

PAR

Albert JAN

Pharmacien

JURY { MM. LUTZ, *Président.*
BACH, *Professeur.*
RÉGNIER, *Chargé de Cours.*

RENNES

SOCIÉTÉ ANONYME DES IMPRIMERIES OBERTHUR

1939

Personnel de la Faculté de Pharmacie de Paris

ADMINISTRATION

MM. DAMIENS, *Doyen*, O. ✱, ☉ I.
 P. LEBEAU, *Assesseur*, O. ✱, ☉ I. Membre de l'Institut.
 H. J. LIONNET, *Secrétaire*, ☉ I.



PROFESSEURS

MM. LEBEAU, O. ✱, ☉ I, Membre de l'Institut..	Pharmacie chimique.
GORIS, O. ✱, ☉ I.....	Pharmacie galénique.
DAMIENS, O. ✱, ☉ I.....	Chimie minérale.
HERISSEY, O. ✱, ☉ I.....	Chimie biologique.
SOMMELET, ✱, ☉ I.....	Chimie organique.
LUTZ, ✱, ☉ I.....	Cryptogamie et Microbiologie.
FABRE, ✱, ☉ I.....	Toxicologie.
LAUNOY, O. ✱, ☉ I.....	Zoologie.
DELABY, ✱, ☉ I.....	Chimie analytique.
PICON, ✱, ☉ I.....	Physique.
MASCRÉ, ☉ I.....	Histoire naturelle des médicaments simples d'origine végétale.
BACH, ☉ I.....	Botanique générale.

Doyens honoraires : MM. RADAIS, O. ✱, ☉ I. — GUÉRIN O. ✱, ☉ I.

Professeurs honoraires :

MM. BÉHAL, G. O. ✱, ☉ I, et DELÉPINE, O. ✱, ☉ I, Membres de l'Institut., GUERBET, ✱, ☉ I, PERROT, C. ✱, ☉ I, COUTIERE, O. ✱, ☉ I, BOUGAULT, O. ✱, ☉ I et TASSILLY, O. ✱, ☉ I.

MAITRES DE CONFÉRENCES

FLEURY, ☉ I.....	Hydrologie et Hygiène.
BEDEL, ☉ I.....	Minéralogie, Législation et Démonstration pharmaceutiques.
RÉGNIER, ☉ I.....	Parasitologie.
CHARONNAT, ☉ I.....	Chimie et Pharmacie Chimique.
JANOT.....	Pharmacie galénique et biologie végétale.

CHEFS DES TRAVAUX PRATIQUES

MM. DOMANGE, travaux pratiques de 1 ^{re} année.	Chimie générale et pharmaceutique
GAUTIER, ☉ A, trav. pratiq. de 2 ^e et 3 ^e année.	Chimie analytique.
PARIS.....	Micrographie.
CORRIEZ.....	Physique.
VALETTE, ☉ A.....	Microbiologie.
GUILLOT, travaux pratiques de 4 ^e année....	Chimie biologique, Bromatologie et Pharmacie chimique.

Bibliothécaire en chef : M. GARNIER, ☉ A.

A MON PÈRE, A MA MÈRE,

Témoignage d'affection et de reconnaissance.

A TOUS LES MIENS

A MES AMIS

A LA MÉMOIRE DE MONSIEUR G. ALLAIRE

Pharmacien de 1^{re} classe,
Chevalier de la Légion d'Honneur,

mon premier Maître en Pharmacie.

A MADAME ALLAIRE

Hommage de respectueuse et profonde gratitude.

A MONSIEUR C. LENORMAND

Professeur honoraire de Chimie analytique à l'Ecole
de Pharmacie de Rennes,
Chevalier de la Légion d'Honneur,
dont j'ai été le Préparateur pendant deux ans.

*Qu'il veuille bien trouver ici l'assurance d'un
souvenir ému et de mes sentiments respectueux
et reconnaissants.*

A MON PRÉSIDENT DE THÈSE

MONSIEUR LE PROFESSEUR L. LUTZ

Professeur de Cryptogamie-Microbiologie à la Faculté
de Pharmacie de Paris,
Chevalier de la Légion d'Honneur,

*Auquel j'adresse l'expression de ma respectueuse
gratitude pour l'intérêt constant qu'il a bien voulu
porter à mes modestes recherches.*

INTRODUCTION

Le 10 octobre 1933, lors d'un ensemencement de mucus pharyngé, sur sérum de bœuf coagulé, nous obtenions, après 24 heures d'étuve à 37°, des colonies rouges et des colonies blanches.

Les colonies blanches examinées après coloration et repiquées sur différents milieux nous permettaient d'isoler : Bacille diphtérique, Staphylocoque, Streptocoque.

Restaient les colonies rouges. Elles nous préoccupaient surtout. Après obtention d'une culture pure, nous inoculons 2 cm³ d'une émulsion dans l'eau physiologique sous la peau d'un lapin de 2 kil. 300. Nous obtenions les phénomènes suivants : diarrhée, paralysie du train postérieur, œdème au point d'inoculation et mort de l'animal au 13^e jour.

Ces résultats nous décidèrent à étudier davantage notre germe chromogène.

Nous regrettons aujourd'hui d'avoir travaillé, au début, sans plan bien tracé, dans le but tout simplement de faire, selon le mot de Claude Bernard, « *des expériences pour voir* ». Un matériel insuffisant, une inexpérience de certaines techniques, une maladresse dans les inoculations, une hésitation à interpréter comme vrais les résultats observés et aussi les occupations multiples qu'apporte chaque jour la tenue d'une officine et d'un laboratoire d'analyses médicales expliqueront nos premiers tâtonnements.

Nous fîmes part de nos essais à M. le professeur Lutz et lui expédiâmes quelques tubes de nos meilleures cultures. Une réponse bienveillante et pleine d'encouragement nous fit reprendre nos expériences initiales. Notre germe s'apparentait aux *Prodigiosus*, mais il méritait d'être suivi.

Peu de temps après, M. Lutz isolait un autre microbe rouge d'un fumier de champignoniste, et nous l'envoyait à étudier. Ces deux nouvelles souches mises en parallèle, avec les trois germes : *Serratia marcescens*, *Serratia kiliensis*, *Serratia essayana* qu'avait étudiés Combe, pouvaient être l'objet d'une nouvelle contribution à l'étude du genre *Serratia*.

Pour compléter notre travail, notre Maître nous proposa quelques expériences relatives au phénomène de chromogénèse.

Ainsi, nous avons le plan de toute une série de recherches variées dont la mise au point a été un peu longue, mais au cours desquelles nous n'avons jamais éprouvé de découragement.

Guidé par les conseils les plus judicieux de notre Maître, nous n'aurions pas voulu abandonner cette étude à laquelle il apportait lui-même tout son dévouement.

Qu'il reçoive ici tous nos sentiments de vive gratitude et l'expression de notre profond attachement.

Nous restons très sensible à la sympathie que nous ont toujours témoignée M. le docteur Rousseau, et M. Chartier, assistant de Microbiologie, au cours de nos visites au laboratoire de la Faculté.

A M. Bach, professeur de Botanique, et à M. Régner, chargé du cours de Bactériologie, qui nous ont fait l'honneur d'accepter de faire partie du jury de cette thèse, nous adressons nos très respectueux remerciements.

PLAN DU TRAVAIL

PREMIERE PARTIE

Morphologie et Biologie de deux Serratia nouveaux.

CHAPITRE I

Généralités sur les microbes à pigment rose ou rouge.

CHAPITRE II

- a) Origine des souches étudiées.
- b) Morphologie. Dimensions.
 - 1. — Sur milieux solides.
 - 2. — Sur milieux liquides.
- c) Mobilité.
- d) Coloration. Capsule. Vacuole.

CHAPITRE III

Caractère des cultures.

- a) Aspect macroscopique des cultures.
 - 1. — Sur milieux solides.
 - 2. — Sur milieux liquides.
- b) Variations résultant d'agents physico-chimiques extérieurs.

CHAPITRE IV

Le pigment.

CHAPITRE V

- a) Etude de l'évolution des cultures.
- b) Etude de certaines fonctions diastasiques .

Sur la gélatine.

le lait.

le sérum de bœuf.

l'albumine.

les peptones.

- c) Fermentation des glucides.

- d) Pouvoir réducteur :

Sur les noyaux sulfurés.

les nitrates.

les molybdates.

certaines matières colorantes.

le pigment.

CHAPITRE VI

- a) Résistance aux antiseptiques courants.
- b) Variations morphologiques provoquées par la présence d'antiseptiques.

CHAPITRE VII

- a) Pouvoir pathogène.
- b) Caractères sérologiques.

CHAPITRE VIII

Place des deux microbes dans la classification.

SECONDE PARTIE

Contribution à l'étude du phénomène de Chromogénèse.

CHAPITRE I

Généralités sur la chromogénèse.

CHAPITRE II

1° Influence des métaux catalyseurs.

2° Influence des sources de carbone.

CHAPITRE III

Discussion du phénomène de chromogénèse.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES.

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

PREMIERE PARTIE

Morphologie et Biologie de deux *Serratia* nouveaux.

CHAPITRE I

Généralités sur les microbes à pigment rose ou rouge.

Enumérons d'abord les principaux microbes à pigment rose ou rouge en les comparant sommairement aux germes étudiés par nous.

Microbes chromogènes très différents des nôtres.

- a) *Micrococcus roseus*.
- b) *Micrococcus rouge cerise* de List [88] à matière colorante insoluble dans l'eau, l'alcool, l'éther.
- c) *Coccus rouge* de Maschek [94] ou *Micrococcus carneus* de Zimmermann [131].
- d) *Micrococcus cerasinus*, isolé d'un lait rouge (Keferstein) [64].
- e) *Micrococcus bactericeus*, isolé de la bouche (Freund) [50].
- f) *Micrococcus coccineus*, isolé d'un fromage (Adametz) [1].
- g) *Micrococcus bicolor*, isolé du tube digestif d'oiseaux (Kern) [67].

Tous ces germes ne liquéfient pas la gélatine.

Microbes chromogènes présentant quelques analogies avec les nôtres.

a) *Bacillus prodigiosus* type.

Nombreuses ressemblances tant au point de vue morphologique que biologique. — Différences importantes : le pigment du germe isolé de la gorge s'est produit à 37° et s'est maintenu jusqu'au 13^e passage à cette température, au cours de nos premières expériences. Le germe du fumier pigmente en rose-rouge. Tous les deux poussent mieux sur sérum de bœuf coagulé et le liquéfient plus vite que *B. prodigiosus*.

b) *Bacille rouge* de Kiel et *Bacille de l'eau* d'Essay.

Dimensions supérieures. Au-dessus de 35° leurs cultures ont toujours été considérées comme incolores.

c) *Bacillus indicus*.

Pigment peu abondant sur sérum de bœuf coagulé. Des traces d'ammoniaque l'avivent et le font virer au pourpre.

d) *Bacillus ruber* de Plymouth.

Liquéfie la gélatine en 15 ou 20 jours. Sur tous les milieux à 37° garde sa coloration. Odeur fécaloïde.

e) *Erythro-Bacille* de Saverio Santori [113].

Pas de pigment à 37°. Agent de l'épizootie des poulaillers.

f) *Bacillus rosaceus metalloides* de Dowdeswell [42].

Pas de développement à 35°.

g) *Bacille rouge* de l'eau de Lustig [89].

Sur pomme de terre, culture grisâtre.

h) *Bacille de la sardine* ou *Cocco-Bacille de la sardine*
de Dubois Saint-Sévrin [43].

Sur gélose, couche glaireuse toujours blanche.

i) *Bacille rouge de Terre-Neuve* de Le Dantec [84].

Présente une spore lui permettant de résister une
minute à 95°-100°.

j) *Bacillus lactis erythrogenes*.

Non mobile. Rouge sur le lait; jaunâtre sur les
autres milieux.

k) *Bacille rouge* de Cozzolino [39].

Trouvé lors d'une épidémie de choléra infantile.

Longueur = 4 μ . Pigmente sur tous les milieux.

l) *Bacillus mesentericus ruber* (Globig) [53].

Coloration des cultures, rose blanchâtre.

m) *Bacille rouge pathogène* de Thévenin [119].

Trouvé par Thévenin (1897-1898) dans un pus
retiré de la région hépatique d'un malade. A tué :
le cobaye, le lapin, la souris. Cultures très colo-
rées en bouillon et en milieu peptoné.

A la suite de ces microbes étudiés depuis longtemps,
nous avons consulté la liste des 27 germes du genre
Serratia donnée dans *Bergey's manual of determinative
Bacteriology* [18 bis].

6 d'entre eux sont considérés comme présentant des
caractères insuffisamment constants pour être classés
définitivement : *Serratia pyoseptica*, *S. fuchsina*, *S. mi-
neacea*, *S. amylo rubra*, *S. rutilis*, *S. rutilescens*.

6, ne réduisent pas les nitrates : *S. rubida*, *S. rubra*, *S. salinaria*, *S. rubrica*, *S. ruĝa*, *S. rubropertincta*.

8, ne liquéfient pas la gélatine : *S. lactorubefaciens*, *S. corallina*, *S. havaniensis*, *S. rubefaciens*, *S. latericea*, *S. rosea*, *S. Bruntzii*, *S. Miquelii*.

2 sont immobiles : *S. lactica*, *S. subruĝa*.

1 est à Gram positif : *S. rosea alba*.

Les autres microbes décrits dans cet ouvrage sont : *S. plymouthensis*, *S. indica*, *S. marcescens*, *S. kiliensis*.

Nous en avons déjà parlé, et nous avons montré, brièvement peut-être, mais suffisamment, quel caractère distinctif les séparait de nos germes, et nous avait amené à poursuivre l'étude de ceux-ci.

CHAPITRE II

Origine des Souches.

La première souche que nous désignerons provisoirement sous la rubrique *A. J.* a été isolée par nous le 14 octobre 1933, lors d'un examen de mucus pharyngé que nous avons ensemencé sur sérum de bœuf coagulé.

Ce microbe était associé à du *Bacille diphtérique*, à des *Staphylocoques* et des *Streptocoques*.

La seconde souche que nous appellerons *L. L.* a été isolée par M. le Professeur Lutz d'un fumier de champignoniste, en 1936.

Morphologie — Dimensions.

Les caractères morphologiques étaient, jusqu'à ces dernières années, considérés comme fixes.

Les milieux normaux définis par Grimbert [54], par Minoux [96] et qui étaient des milieux usuels (bouillon, eau peptonée, gélose, gélatine, pomme de terre) devaient donner des formes normales.

A la suite d'observations et d'expériences attentives (Clark et Ruehl (1919) [35], A.-T. Henrici (1925) [58], Rolin (1929) [109], M^{me} Kaplan (1931) [62], Marchal (1932) [91]) ces notions ont perdu leur rigidité.

Sans qu'il soit besoin d'étudier la morphologie dans des conditions nettement défavorables, il apparaît à la

suite de tous ces travaux qu'un germe ne se présente pas toujours aux yeux de l'observateur sous une forme immuable et définitive.

Nos deux souches nous ont permis de faire ces constatations.

Nous avons noté quelques variations morphologiques suivant qu'il s'agissait de milieux solides ou liquides, suivant que la température de culture était de 22° (température courante) ou de 37°, qui n'est cependant pas, à proprement parler, une température dysgénésique.

1. — Caractères morphologiques sur milieux solides à la température de 22°.

1. — Sur gélose, au bout de 24 heures.

A. J. se présente en éléments cocco-bacillaires ou bacillaires très courts, la longueur étant de 1^u à 1^u2, et la largeur 0^u5 à 0^u8.

L. L. nous montre des éléments de deux types : un type *a* représenté par des éléments analogues à ceux décrits ci-dessus; ce sont les plus nombreux. A côté, existe un type *b* de forme bacillaire dont la longueur serait de 2^u1. Il est vraisemblable qu'il s'agit d'une association de cocco-bacilles reliés par la capsule.

Tous ces germes se présentent seuls ou groupés deux par deux.

Sur gélose, au bout de 48 heures.

Les éléments sont semblables à ceux observés après 24 heures.

II. — *Sur sérum de bœuf coagulé, au bout de 24 heures.*

A. J. comme *L. L.* ne montrent que des éléments nettement cocco-bacillaires, c'est-à-dire des germes plus courts que sur gélose.

Sur sérum de bœuf coagulé, au bout de 48 heures.

Même description.

Caractères morphologiques sur milieux solides à la température de 37°.

La température de 37° permet, pour nos deux microbes, une culture aussi abondante et *plus rapide* qu'à 22°. Elle n'a qu'un effet particulier, c'est d'empêcher la chromogénèse.

I. — *Sur gélose, au bout de 24 heures.*

Les éléments *A. J.* paraissent un peu plus trapus qu'à la température de 22°. Leur longueur est la même; la largeur s'est légèrement accrue. On a ainsi une bactérie d'aspect légèrement gonflé. Nous n'avons pas trouvé de formes allongées.

La plupart des éléments de *L. L.* semblent également épaissis, mais ici nous avons remarqué quelques rares formes allongées où la longueur atteint 2^μ à 3^μ, et surtout de véritables files de microbes mesurant en général 4^μ à 5^μ et pouvant aller jusqu'à 10^μ.

Sur gélose, au bout de 48 heures.

Pas de changements sensibles.

II. — *Sur sérum de bœuf coagulé, au bout de 24 heures.*

A. J. se présente en éléments nettement cocco-bacillaires. Les éléments dits : *gonflés* ne sont pas aussi évidents que sur gélose.

L. L. montre également des formes cocco-bacillaires et contrairement à ce qui s'est passé sur gélose, nous n'avons noté aucune forme allongée.

Sur sérum de bœuf coagulé, au bout de 48 heures.

Même description.

2. — **Caractères morphologiques sur milieux liquides à la température de 22°.**

I. — *Sur eau peptonée* ⁽¹⁾, *au bout de 24 heures.*

A. J. se présente en éléments cocco-bacillaires avec coloration bi-polaire très nette. Les dimensions notées le plus souvent sont $1^{\mu}8 \cong 1^{\mu}$.

Pour *L. L.* les dimensions sont : $1^{\mu}4 - 1^{\mu}7 \cong 0^{\mu}8$, mais ce sont les éléments courts qui dominent.

Sur eau peptonée, au bout de 48 heures.

A. J. : $1^{\mu}2 - 1^{\mu}5 \cong 0^{\mu}8$.

L. L. : $1^{\mu} - 1^{\mu}2 \cong 0^{\mu}8 - 1^{\mu}$.

II. — *Sur milieu Lasseur I* ⁽²⁾, *au bout de 24 heures.*

La coloration est plus homogène que sur eau peptonée.

A. J. a des formes très régulières : $1^{\mu}2 - 2^{\mu} \cong 1^{\mu}$.

L. L. : $1^{\mu}5 - 1^{\mu}8 \cong 0^{\mu}8$.

Sur milieu Lasseur I, au bout de 48 heures.

A. J. et *L. L.* n'offrent que des éléments très courts où il est difficile de distinguer la longueur de la largeur : $1^{\mu}2 - 1^{\mu} \simeq 0^{\mu}8 - 1^{\mu}$.

Caractères morphologiques sur milieux liquides à la température de 37°.

I. — *Sur eau peptonée, au bout de 24 heures.*

A. J. s'allonge, et on observe la constitution de véritables files de bactéries : $2^{\mu}2 - 4^{\mu} - 5^{\mu} \simeq 1^{\mu}$.

Certaines files ont 24^{μ} , et sont constituées par 8 bactéries de 3^{μ} environ, placées bout à bout. Tous ces germes gardent leur forme rectiligne.

Chez *L. L.* la modification semble encore plus brutale. Certaines formes allongées ont 25^{μ} à 30^{μ} . D'autres sont à la fois allongées et gonflées : $5^{\mu} - 10^{\mu} \simeq 1^{\mu}5$. De plus, toutes ces bactéries se sont incurvées.

Sur eau peptonée, au bout de 48 heures.

Des formes longues existent toujours chez les deux germes; toutefois, il semble qu'elles soient moins nombreuses.

II. — *Sur milieu Lasseur I, au bout de 24 heures.*

Contrairement à ce qui s'est passé sur eau peptonée : *A. J.* ne donne plus de formes allongées : $1^{\mu}5 \simeq 0^{\mu}8$.

(1) Toutes nos eaux peptonées ont été faites avec de la peptone pepsique Chapoteaut et de l'eau distillée, à 2 %, et ajustées à pH=7,2.

(2) Formule du milieu Lasseur I : Asparagine = 0 gr. 90; Glycérine = 2 gr. 50; Phosphate bipotassique = 0 gr. 25; Sulfate de magnésie = 0 gr. 50; Chlorure de calcium = 0 gr. 04; Sulfate ferreux = 0 gr. 01; H₂O dist. = Q. S. p. 100°c amené à pH=7 à 7,2.

L. L. montre de nombreux éléments de taille normale et quelques formes allongées de 5^{μ} à 6^{μ} , mais toutes droites et non incurvées. On y rencontre aussi quelques files de bactéries.

Sur milieu Lasseur, au bout de 48 heures.

Pas de changement chez *A. J.*

Chez *L. L.* beaucoup de formes allongées ont disparu.

CONCLUSIONS

Le milieu :

1° Sur gélose, *A. J.* et *L. L.* sont des bacilles courts : $1^{\mu} - 1^{\mu}2 - 1^{\mu}5 \cong 0^{\mu}5 - 0^{\mu}7$, tandis que sur sérum de bœuf coagulé ce sont surtout des formes cocco-bacillaires.

2° L'observation à différents stades de la culture ne permet pas de noter de variations bien sensibles. Il y a donc une certaine stabilité morphologique sur ces milieux.

3° Sur les milieux liquides (eau peptonée et milieu Lasseur I), à la température de 22° , après 24 heures, *L. L.* se présente comme un Bacille plus court et plus grêle que *A. J.* :

L. L. : $1^{\mu}5 - 1^{\mu}8 \cong 0^{\mu}6 - 0^{\mu}8$.)

A. J. : $1^{\mu}8 - 2^{\mu} \cong 0^{\mu}8 - 1^{\mu}$.)

Contrairement à ce qui se passe sur les milieux solides, la morphologie subit une légère modification. sur les milieux liquides, suivant l'âge de la culture.

Après 48 heures, on note un raccourcissement des formes :

(*A. J.* : 1^μ2 à 1^μ5.)

(*L. L.* : 1^μ à 1^μ2.)

La température :

La température, *même non dysgénésique*, a une influence très nette sur la forme des germes.

Nous remarquons :

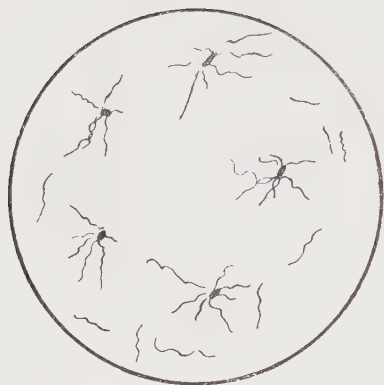
1° Qu'elle est plus nette sur eau peptonée que sur milieu Lasseur I et sur les milieux solides et, chez ceux-ci, plus nette sur gélose que sur sérum de bœuf.

2° Que *L. L.*, quoique germe normalement plus court que *A. J.* subit sous l'influence d'une élévation de température des variations morphologiques plus considérables.

3° Les grandes modifications sur eau peptonée sont le résultat uniquement de la température et non du milieu initial. En effet, nous reportant à la thèse de Pascal (1938) [100] qui a montré l'influence des produits réducteurs sur les formes géantes de *Streptocoques*, nous avons vérifié si l'eau peptonée à cette température de 37° n'acquerrait pas des propriétés réductrices. Les résultats ont été *négatifs*.

Cette simple comparaison dans l'étude morphologique, sur les milieux courants, suffit déjà à différencier nos deux germes.

Mobilité.



Souche A. J. { 6 à 8 cils
Longueur :
= 2 à 3 fois le microbe.



Souche L. L. { 8 à 10 cils
Longueur :
= 3 à 4 fois le microbe.

Examinés entre lame et lamelle, les deux germes sont mobiles. Leurs mouvements ressemblent à ceux des bacilles du groupe *typhique*; ils sont très rapides et se font dans tous les sens.

Nous avons mis les cils en évidence par la méthode de Tribondeau [121], au cristal-violet.

Nous avons obtenu de bons résultats, en nous servant de cultures très jeunes, sur gélose, ayant au plus 15 heures d'étuve à 22°-25°, *car les cils ne sont plus visibles dans une culture de 24 heures à 22°, ni dans une culture très jeune à 37°.*

Coloration — Vacuole — Capsule.

Sur gélose, sérum de bœuf, eau peptonée, bouillon, milieu Lasseur I, *A. J.* et *L. L.* ne prennent pas le *Gram*.

Le temps nécessaire à la décoloration par l'alcool à 95° est de 5" à 6".

Les autres méthodes de coloration : fuchsine diluée, méthode de Pappenheim [98], coloration vitale par le rouge neutre, laissent voir autour du germe, en diaphragmant un peu, et selon les milieux, une zone hyaline très nette qui correspond à une *capsule*.

On remarque aussi avec tous ces colorants que la coloration est surtout importante aux extrémités. Le centre du bacille est souvent vide de toute matière colorante, ce qui laisserait supposer la présence d'une *vacuole*.

CHAPITRE III

Aspect macroscopique des cultures sur milieux solides.

Sur gélose :

A la température de 22°, *A. J.* et *L. L.* montrent leurs colonies au bout de 8 à 10 heures. Ces colonies sont rondes et lisses; elles correspondent donc l'une et l'autre à la variété *Smooth*.

Au bout de 15 à 20 heures la pigmentation apparaît.

Pour *L. L.* le milieu semble assez favorable; on a une teinte rose-rouge très nette sur toute la colonie.

A. J. a une teinte plus foncée, mais bien souvent la pigmentation n'a lieu qu'à la périphérie.

Si l'ensemencement est très chargé, les colonies se réunissent en un ruban très épais tout le long du tube.

Sur sérum de bœuf coagulé.

La croissance se fait de la même façon. Toutefois le milieu est plus favorable au développement et à la pigmentation de *A. J.*

La culture est suivie de la liquéfaction du milieu, plus rapide pour *A. J.* que pour *L. L.*

Sur pomme de terre :

La pomme de terre permet la culture des deux germes, mais ne semble pas aussi favorable à la chromogénèse que pour *Serratia marcescens* et *S. kiliensis*.

Aspect macroscopique des cultures sur milieux liquides.

Sur bouillon et eau peptonée.

C'est sur ces milieux liquides courants que les deux germes poussent le plus rapidement. Au bout de 6 à 7 heures, à 22°, on décèle un trouble, alors qu'on n'aperçoit pas encore les rubans d'ensemencement sur les milieux solides.

Le trouble est uniforme dans les premières heures, puis apparaissent des ondes soyeuses comme dans une culture de *colibacille*. Au bout de 3 ou 4 jours un léger dépôt se forme dans le tube. Les milieux ne sont pas colorés, mais parfois au bout de 24 heures, plus souvent au bout de 48 heures et au delà, un liseré rose très adhérent au verre et plus ou moins teinté naît au niveau du liquide.

Le dépôt signalé plus haut est parfois pigmenté au bout de quelques jours.

L'odeur des cultures est plutôt agréable.

Sur milieu Lasseur 1.

Jusqu'à la 12° heure, on n'observe aucun trouble. Celui-ci n'apparaît que très légèrement entre 12 heures et 24 heures. Ce milieu a été considéré comme très favorable à la chromogénèse. Lasseur [76-77] l'a essayé avec succès pour le *Bacillus chlororaphis* pour le *B. Le Monnieri*; A. Dupaix [45] pour le *B. Beijerinck-Dupaix*, et Combe [36] pour les trois germes, *Serratia marcescens*, *S. kiliensis*, *S. essayana*.

Avec *A. J.* à 22°, le développement se dessine au bout de 12 à 16 heures, mais nous obtenons d'une façon constante des cultures presque *achromogènes*; un simple liseré rose pâle se manifeste parfois.

Avec *L. L.* le développement suit une marche parallèle. La pigmentation se traduit par un *voile crémeux rose* s'épaississant au bout de quelques jours et laissant diffuser un peu de matière colorante au sein du liquide sous-jacent.

Influence d'agents physico-chimiques extérieurs sur les cultures.

I. — *Le pH :*

Les zones de croissance sont assez larges. On peut obtenir des cultures de $\text{pH}=4,5$ à $\text{pH}=9$, sur eau peptonée et sur milieu Lasseur I.

Les zones de pigmentation sont plus restreintes. Sur milieu Lasseur I, pour *L. L.*, elles sont bonnes de 5,6 à 6,8-7, et s'affaiblissent ensuite.

II. — *La température :*

La température est un facteur important dans la croissance, mais surtout dans la pigmentation.

a) *Croissance :*

Sur sérum de bœuf, pour *A. J.*, les limites de croissance vont de +8° à + 42°. A +8° la culture apparaît au 7^e jour ; à +42° aux environs de la 30^e heure.

Pour *L. L.* les limites sont comprises entre + 13° et +38°. A +13° la culture commence au bout de 66 heures; à +38° au bout de 13 à 14 heures.

Des températures plus élevées abolissent la vie microbienne : les deux germes sont tués au bout de 5 minutes à $+100^{\circ}$. Ils résistent 48 heures à $+45^{\circ}$; 3/4 d'heure à $+56^{\circ}$; 20 minutes à $+65^{\circ}$ - $+68^{\circ}$; 1/4 d'heure à $+68^{\circ}$ - $+70^{\circ}$.

b) *Pigmentation* :

Les limites de pigmentation, étudiées sur sérum de bœuf coagulé, sont résumées dans le tableau suivant :

Température	A. J.	L. L.
$+ 8^{\circ}$	Pigmentation au 8 ^e jour.	O
$+ 13^{\circ}$	— après 66 h.	Culture incolore.
$+ 14^{\circ}$	— — 42 h.	Pigmentation après 76 h.
$+ 15^{\circ}$	— — 34 h.	— 56 h.
$+ 17^{\circ}$	— — 24 h.	— 34-36 h.
$+ 18^{\circ}$	— — 24 h.	— 34 h.
$+ 20^{\circ}$	— — 18 h.	— 24 h.
$+ 21^{\circ}$	— — 17 h.	— 21 h.
$+ 22^{\circ}$	— — 14 h.	— 19 h.
$+ 25^{\circ}$	— — 13 h.	— 17 h.
$+ 28^{\circ}$	— — 10 h.	— 13 h.
$+ 30^{\circ}$	— 10-12 h.	— 12-13 h.
$+ 32^{\circ}$	On note à partir	— 10-12 h.
$+ 33^{\circ}$	de cette tempéra-	— 10-12 h.
$+ 34^{\circ}$	ture une diminu-	— 10-12 h.
$+ 35^{\circ}$	tion dans l'inten-	— 10-12 h.
$+ 37^{\circ}$	sité du pigment.	— 10-12 h.
$+ 38^{\circ}$	Culture achromogène.	O
$+ 40^{\circ}$	—	O
$+ 41^{\circ}$	—	O

Ces tableaux sur les températures de pigmentation nécessitent quelques remarques :

a) Dans les différentes cultures, nous avons dit que la pigmentation apparaissait au bout d'un temps T. Il s'agit là d'un temps moyen, du temps observé le plus

couramment, car il est arrivé quelques rares fois qu'à +14-15°, par exemple, la pigmentation soit apparue au bout de 18 heures, qu'à +37° elle le soit au bout de 10 heures (cette dernière chez *A. J.* évidemment).

b) Lorsqu'on réensemence, à la même température, une culture à belle pigmentation sur une suite de tubes de sérum de bœuf, les générations qui se succèdent ne sont pas aussi belles, au point de vue chromogène que les cultures initiales.

c) Les vieilles cultures repiquées, même à une température convenable, ne pigmentent pas toujours d'une façon régulière.

d) On peut récupérer le pouvoir chromogène en portant le nouvel ensemencement à une température voisine de l'optimum ou légèrement supérieure (3 heures à +28°-+30° par exemple), et en le ramenant à +18° environ. En opérant ainsi pour *A. J.*, la pigmentation est apparue au bout de 7 heures.

III. — L'oxygène :

Combe [36] considère *Serratia marcescens*, *S. kiliensis*, *S. essayana* comme des aérobies stricts. Ses études ont été faites seulement sur milieu Lasseur I, privé d'air.

Pour nos deux germes, nous n'avons pu réaliser le même genre d'expériences, faute d'installation suffisante.

Nous avons ensemencé *A. J.* et *L. L.* :

a) En gélose profonde de Veillon.

b) En tubes de bouillon et sur sérum de bœuf ; ces tubes étant placés chacun dans un plus gros tube (genre tube pour pomme de terre) au fond duquel se trouvait

une solution de pyrogallol + potasse. (pyrogallol = 1 gr. + KOH, en pastille = 1 gr. + H²O = 10 cc.).

c) En tubes d'eau peptonée, et en milieux Lasseur I recouverts de bouchons de lanoline, selon la technique de Pascal [100]. (*Thèse Pharmacie, 1938, page 34.*)

Tous ces milieuxensemencés ont été placés à une température variant de +25° à +30°.

Au bout de 12 heures, les milieux solides montrent des traînées d'ensemencement ; le bouillon et l'eau peptonée sont nettement troublés.

Seul, le milieu Lasseur ne permet pas un développement apparent dans ces conditions, les tubes restant très limpides.

Toutes ces cultures sont *achromogènes*, mais la pigmentation pourra être récupérée rapidement en présence d'air libre.

Nous l'avons vérifié de plusieurs façons :

1° En retirant le tube de sérum de bœuf du tube à pyrogallol et en le replaçant seul à l'étuve à 30°.

2° En ensemençant sur de nouveaux tubes, soit une colonie incolore, soit une colonie des tubes de Veillon.

Dans tous les cas les nouveaux milieux au sérum de bœuf ont pigmenté au bout de 8 à 9 heures.

En conséquence :

1° Nos deux germes sont des *anaérobies facultatifs*.

2° La fonction de pigmentation n'est pas anéantie complètement, même après que les cultures ont séjourné 3 jours dans une atmosphère privée d'oxygène.

IV. — La lumière.

La lumière ne semble pas avoir d'influence bien nette sur le développement et la pigmentation de nos germes.

V. — *Le temps.*

Le temps modifie l'aspect des cultures. Les milieux solides, gélose et pomme de terre, ne sont guère influencés, mais le sérum de boeuf est complètement liquéfié.

Le pigment, par oxydation, passe souvent au violet foncé. Les milieux liquides perdent leur trouble homogène.

Des cultures gardées pendant un an nous ont permis d'observer des formes anormales à côté des formes typiques. Repiquées, quelques-unes de ces formes ont persisté pendant trois ou quatre passages. Ces nouvelles cultures étaient *achromogènes*.

CHAPITRE IV

Le Pigment.

Sur gélose et sur sérum de bœuf coagulé, les pigments de *A. J.* et de *L. L.* paraissent un peu différents, *A. J.* se présentant le plus souvent très rouge, et *L. L.* rose-rouge.

Les tentatives d'extraction que nous avons faites, et les différents traitements que nous avons fait subir aux pigments, nous ont amené à penser que ces substances étaient très voisines, sinon semblables, ainsi que Lasseur et Girardet [79] l'ont démontré pour *Serratia marcescens* et *S. kiliensis*.

Nous avons traité nos cultures sur gélose âgées de 48 heures de la façon suivante :

1° Emulsion de la bande d'ensemencement dans de l'eau distillée à 50° environ.

2° Addition à l'émulsion de 1/10^e de son volume de sous-acétate de plomb liquide. Il se fait un précipité qui adsorbe toute la matière colorante. On filtre sur un filtre sans plis.

3° On lave le précipité à l'eau distillée chaude ; le pigment ne passe pas en solution.

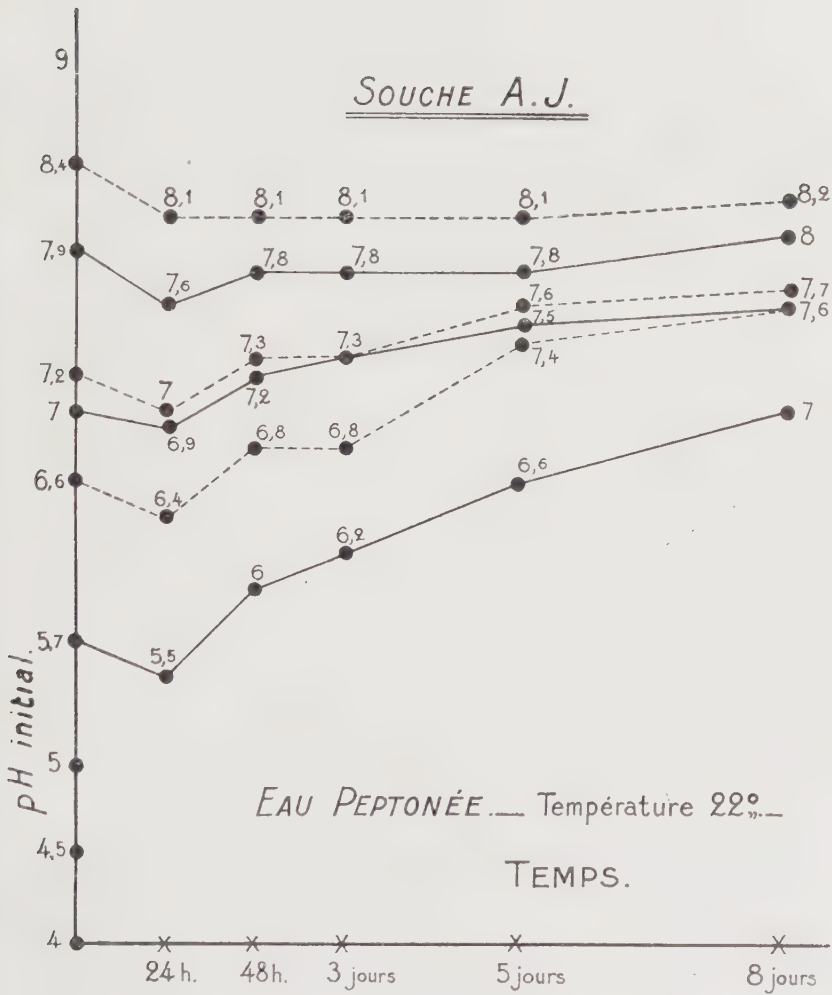
4° On dissout la matière colorante à l'aide d'alcool à 95° additionné de 1 % de SO_3H^2 (ceci, dans le but de ne pas entraîner de plomb).

On obtient une solution limpide d'un rouge plus ou moins foncé, possédant les propriétés générales de la *prodigiosine*.

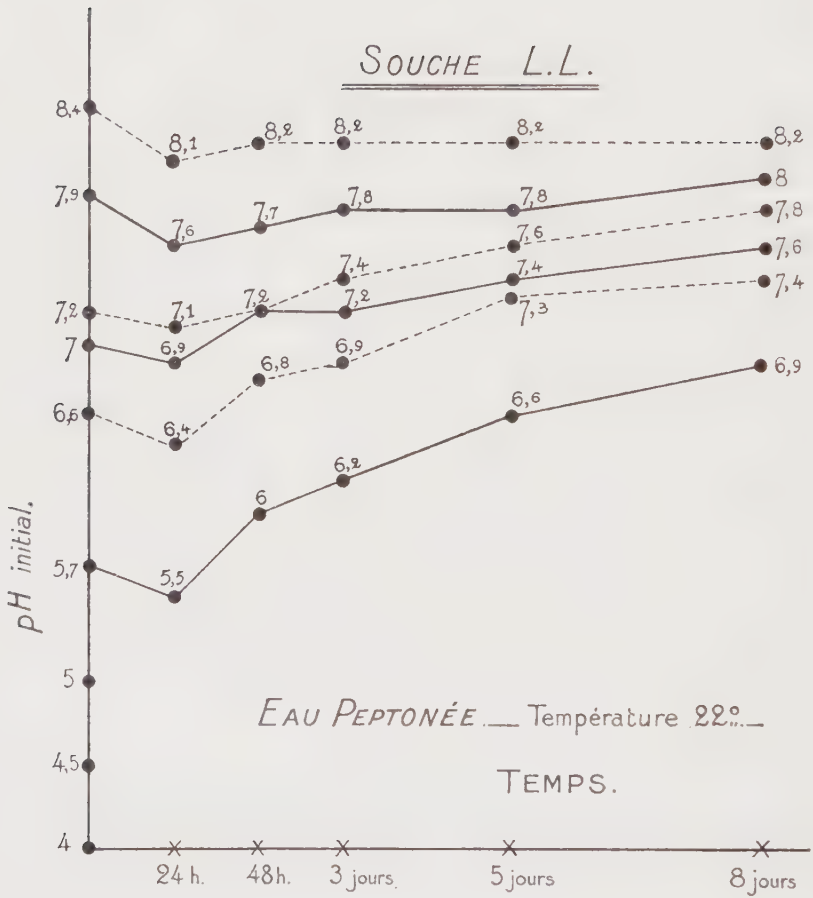
La teinte s'accroît en milieu acide et passe au jaune en milieu sodique ou ammoniacal.

Elle est stable en présence de son volume d' H_2O_2 à 20 volumes, en présence de réducteurs assez puissants tels que le formol, le bisulfite de soude, les solutions de tanin, de résorcine, de pyrogallol.

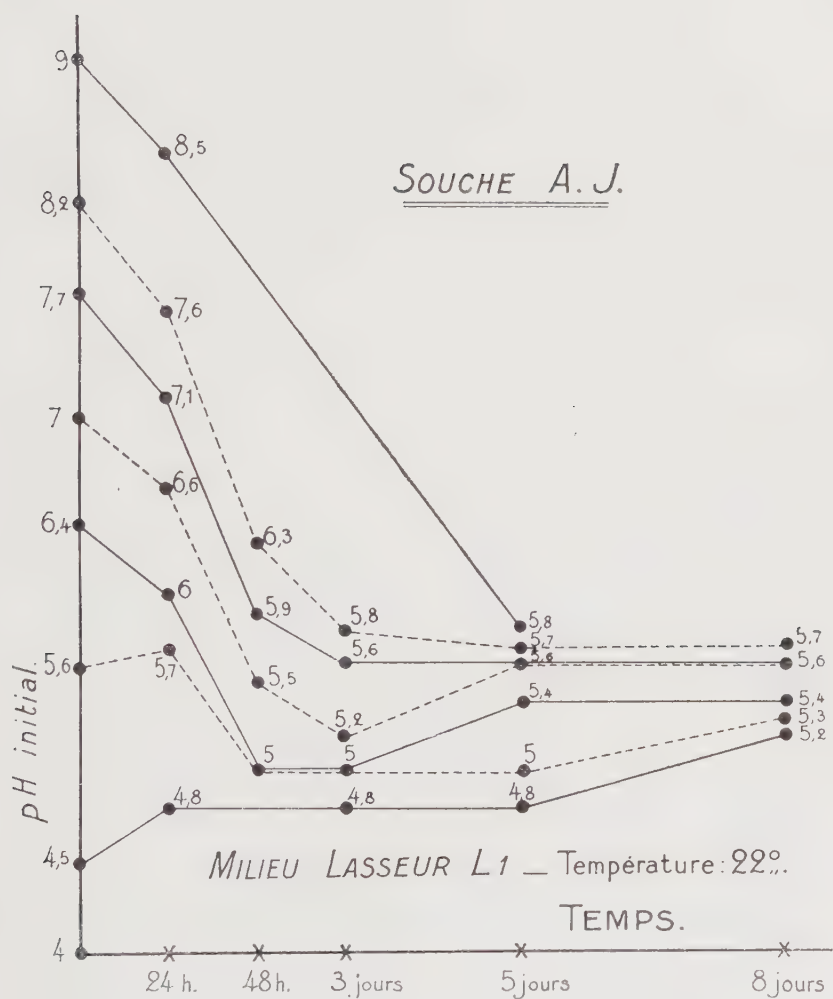
Elle se décolore très lentement au contact de la poudre de zinc seule, ou additionnée d' HCl .



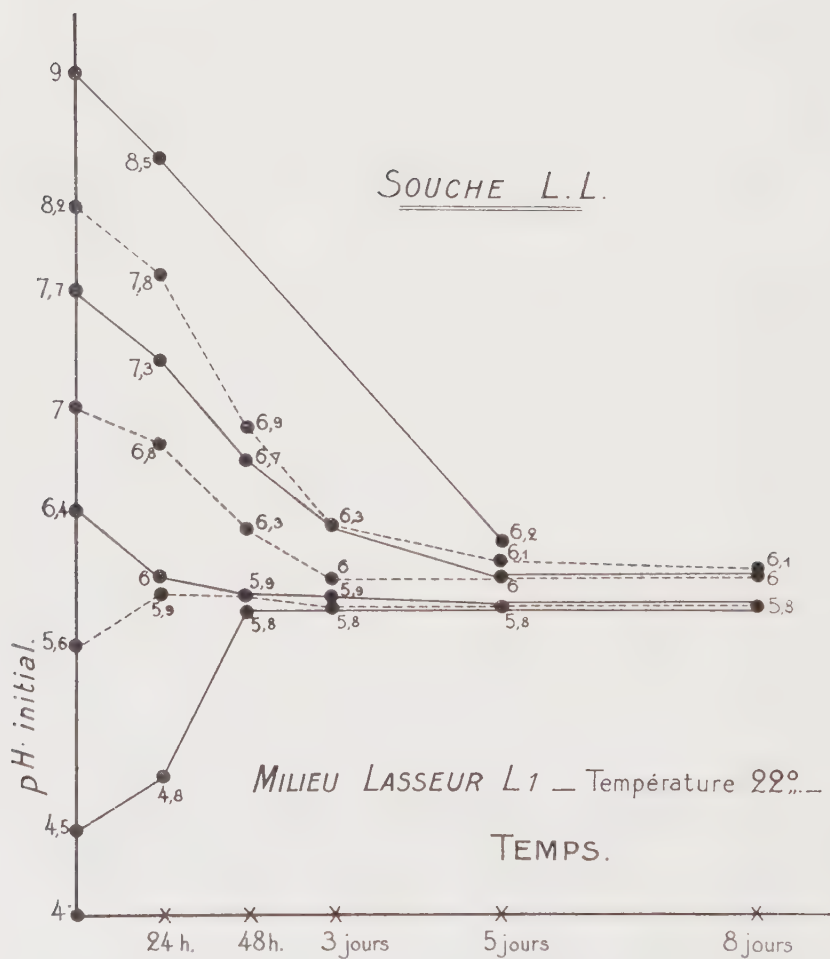
Évolution du pH en eau peptonée avec la souche A. J.



Évolution du pH en eau peptonée avec la souche L. L.



Évolution du pH en milieu Lasseur L1 avec la souche A. J.



Évolution du pH en milieu Lasseur L1 avec la souche L. L.

CHAPITRE V

Ce chapitre étudiera quelques grandes fonctions de la vie microbienne.

Nous le diviserons en quatre parties :

- 1° Etude sommaire du développement des cultures.
- 2° Etude de quelques fonctions diastasiques.
- 3° Etude de la fermentation des glucides.
- 4° Etude du pouvoir réducteur.

Etude du développement des cultures.

Nous avonsensemencé nos germes dans des tubes de 10 cm³ d'eau peptonée de pH 5,5 à 8,5 et dans des milieux Lasseur I de pH 4,5 à 9.

A des temps différents, nous avons mesuré le pH des cultures (méthode colorimétrique). Les graphiques ci-joints résument les différentes réactions obtenues, en fonction du temps et du pH initial.

CONCLUSIONS

1° *En eau peptonée.*

a) Quel que soit le pH initial, les microbes commencent par acidifier le milieu (au bout de 24 heures), puis immédiatement après, les courbes montent progressivement vers l'alcalinité.

b) Les milieux acides et les milieux neutres (5,7 à 7,2) donnent, même après 48 heures, un pH supérieur ou égal au pH initial.

c) Les milieux très alcalins (7,9 à 8,4) donnent un pH légèrement inférieur au pH initial.

d) L'acidification des premières heures n'est pas due à des acides volatils; après chauffage au bain-marie, la réaction reste la même.

2° *En milieu Lasseur I.*

a) Les milieux très acides (4,5 à 5,6) s'alcalinisent au bout de 24 heures et 48 heures, puis se stabilisent après 48 heures vers un pH supérieur au pH initial, mais qui reste acide.

b) Les milieux peu acides (6,4), neutres (7) ou alcalins (7,7-8,2-9) descendent brusquement vers l'acidité et se stabilisent après le 3^e jour vers un pH inférieur au pH initial.

c) Les courbes vers l'acidité sont bien plus accentuées pour la souche *A. J.* que pour la souche *L. L.* Entre le 2^e et le 3^e jour notamment, *A. J.* parvient à une acidité fort marquée.

* En résumé, si l'on compare le pH des points terminus de toutes les courbes, on constate que :

1° Les cultures en eau peptonée évoluent vers un *milieu neutre ou alcalin.*

2° Les cultures en milieu chimiquement défini évoluent vers un *milieu acide.*

Ceci nous montre déjà qu'on peut s'attendre à des phénomènes biologiques tout différents selon l'un ou l'autre mode de culture.

Etude de quelques fonctions diastasiques.

Action sur la gélatine.

A. J. et *L. L.* liquéfient la gélatine à la température de $+15^{\circ}$ à $+17^{\circ}$. On obtient après piqûre une culture en entonnoir.

Avec *A. J.*, un tube de 10 cc. est liquéfié en un mois, alors qu'avec *L. L.* la moitié seulement est attaquée.

Action sur le lait.

A. J. et *L. L.* coagulent le lait écrémé tournesolé, à la température de $+22^{\circ}$ à $+25^{\circ}$, en un temps variant de 24 heures à 36 heures. Avec les deux microbes, le tournesol vire au rouge plus ou moins vif.

Si l'on sépare le liquide du coagulum, qu'on le neutralise et qu'on le filtre sur bougie Chamberland, on obtient un liquide doué de propriétés coagulantes très rapides pour un lait témoin.

Outre l'acidité, il existe donc dans la sécrétion microbienne une diastase agissant comme la *présure* et que l'on trouve dès les premières heures de la culture.

Nous avons recherché par le même procédé, la présence d'une diastase protéolytique, peptonifiant la caséine, c'est-à-dire une *caséase* : le résultat a été *négatif*.

Nous signalons dès maintenant la discordance entre les résultats des cultures sur lait tournesolé et en eau peptonée lactosée.

A. J. et *L. L.* font fermenter le lactose dans le lait. *L. L.* est aussi actif sur le lactose en solution dans l'eau peptonée; *A. J.* ne l'est pas.

Action sur le sérum de bœuf coagulé.

A. J. et *L. L.* liquéfient en 5 ou 6 jours le sérum de bœuf coagulé. Cette action est surtout intense et brutale avec *A. J.* Dans tous les cas, elle est plus nette avec *A. J.* et *L. L.* qu'avec les trois germes étudiés par Combe [36].

Action sur l'albumine d'œuf coagulée.

Action nulle pour les deux microbes.

Action sur les peptones (production d'indol).

Les peptones sont d'excellents aliments pour les bactéries, car elles fournissent, à la fois, l'azote et le carbone nécessaires. Mais l'utilisation des peptones s'accompagne, dans certains cas, d'une attaque de leur noyau tryptophane, laquelle conduit à la production d'indol.

Pour *A. J.* et *L. L.*, nous avons conduit nos expériences de la façon suivante :

Les deux germes, provenant de milieux gélosés, ont étéensemencés sur différentes eaux peptonées à 2 % et portés à une température de +28° à +30° : (*Peptone Chapoteaut* — *Peptone Byla* — et *Peptone Byla* additionnée d'électrolytes : (Peptone : 2 gr. $\text{SO}_4 \text{ Mg}$: 0 gr. 10. Phosphate de soude : 0 gr. 50 — H_2O : 100 grammes); les électrolytes favorisant la production d'indol.

La réaction de Salkowsky n'a pas été effectuée directement sur le tube d'eau peptonée. En effet, on observe souvent à la partie supérieure du milieu un liseré rose, soluble dans l'alcool amylique avec coloration du solvant.

Nous avons préféré distiller le contenu des tubes, au bout d'un temps compris entre 48 heures et 30 jours, et effectuer la réaction sur le distillat.

Dans tous les cas, les résultats ont été *négatifs*.

Des opérations témoins conduites avec du *Colibacille* ont toujours fourni des réactions positives.

Il résulte de ces essais que *A. J.* et *L. L.* sont incapables de désintégrer la molécule protéique jusqu'à formation d'*indol*.

Fermentation des Glucides.

Les trois germes étudiés par Combe [36] se distinguent ainsi sur les milieux sucrés.

Serratia marcescens ne donne de gaz avec aucun des sucres et n'agit pas sur le lactose.

S. kiliensis fait fermenter le glucose, le saccharose et le maltose avec production de gaz et n'agit pas sur le lactose.

S. essayana fait fermenter le lactose avec production de gaz.

Nous avons utilisé pour nos deux germes des tubes d'eau peptonée de 10 cc. à 2 % de pH = 7.2, additionnés de différents sucres (2 %) et de tournesol bleu, les uns sans cloche, les autres avec cloche.

La culture a été faite à 22°-25°.

Action de A. J.

	Après 24 heures.		Après 48 heures.		Après 3 jours.		Après 4 jours.		Après 6 jours.		Après 10 jours.	
	Tournesol Gaz		Tournesol Gaz		Tournesol Gaz		Tournesol Gaz		Tournesol Gaz		Tournesol Gaz	
Amidon.....	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Xylose.....	0	0	?	0	?	0	+	0	+	0	+	0
Arabinose.....	0	0	0	0	0	0	+	0	+	0	+	0
Glucose.....	+	0	+	0	+	0	+	0	—	0	—	0
Lévylose.....	+	0	+	0	+	0	+	0	+	0	+	0
Galactose.....	+	0	+	0	+	0	+	0	+	0	+	0
Saccharose.....	+	0	+	0	+	0	+	0	—	0	+	0
Lactose.....	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Maltose.....	+	0	+	0	+	0	+	0	+	0	+	0
Mannite.....	+	0	+	0	+	0	+	0	—	0	+	0

Action de L. L.

	Après 24 heures.		Après 48 heures.		Après 3 jours.		Après 4 jours.		Après 6 jours.		Après 10 jours.	
	Tournesol Gaz		Tournesol Gaz		Tournesol Gaz		Tournesol Gaz		Tournesol Gaz		Tournesol Gaz	
Amidon.....	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Xylose.....	—	0	—	0	+	0	+	0	—	0	+	0
Arabinose.....	—	0	—	0	+	0	—	0	+	0	+	0
Glucose.....	—	0	—	0	+	0	+	0	—	0	+	0
Lévylose.....	+	0	—	0	—	0	—	0	—	0	+	0
Galactose.....	+	0	—	0	+	0	—	0	—	0	+	0
Saccharose.....	—	0	—	0	+	0	+	0	—	0	+	0
Lactose.....	+	0	—	0	+	0	+	0	—	0	+	0
Maltose.....	+	0	—	0	+	0	+	0	+	0	+	0
Mannite.....	+	0	—	0	+	0	+	0	—	0	+	0

CONCLUSION :

Si l'on remarque, dans l'étude de l'évolution des cultures de nos germes que, en *eau peptonée*, l'acidification disparaît en trois ou quatre jours, avec les *milieux*

sucrés, le rougissement constant du tournesol est bien le résultat de l'attaque du glucide.

En conséquence :

A. J. n'agit sur les sucres en C⁵ qu'au 4^e jour; il attaque rapidement les sucres en C⁶ et C¹² et reste sans action sur le lactose.

L. L. agit également sur tous les sucres.

L'un et l'autre ne dégagent pas de gaz.

Pouvoir réducteur.

Le pouvoir réducteur des bactéries est un phénomène en général assez complexe. Comme les phénomènes précédents, les réductions sont encore le résultat d'actions de diastases auxquelles on donne le nom de *réductases* ou *déshydrogénases*.

Elles peuvent s'exercer sur différentes substances.

Nous les avons étudiées sur les protéines — les nitrates — les molybdates — le bleu de méthylène, et les avons notées simplement, sans les approfondir, sur le pigment.

Action sur le noyau soufré des protéines.

A. J. et *L. L.* noircissent la gélose au plomb; ils dégagent donc de l'hydrogène sulfuré.

Pour préciser cette action, nous avons adopté la technique suivante :

Les milieux ont été constitués par 50 cc. d'eau peptonée à 2 %, de pH=7,2, répartis en petits Erlenmeyers. Après ensemencement, on a bouché avec un bouchon de

liège maintenant contre le goulot de la fiole un papier-réactif au sous-acétate de plomb.

Nous avons obtenu les résultats suivants en prenant comme témoin le *Bacille typhique* :

	A. J.	L. L.	Bacille typhique.
Après 16 heures : Noircissement intense (1).			
		0	0
Après 36 heures :	++++	+	++
Après 48 heures :	++++	++	++++
Après 4 jours :	++++	++++	++++

Nous rappelons que les trois germes étudiés par Combe [36] produisent de l'hydrogène sulfuré, mais avec des intensités différentes; le pouvoir le plus fort appartenant à *Serratia essayana*, puis à *S. kiliensis*; *S. marcescens* n'est que faiblement producteur.

Action sur les Nitrates.

Selon Grimbert [54], l'action des microbes sur les nitrates permet de les classer en deux catégories : les dénitrifiants vrais et les dénitrifiants indirects. Dans ce cas, elle est considérée comme une fermentation et l'attaque plus ou moins avancée du nitrate n'est que la conséquence du processus de cette fermentation.

Les conceptions modernes sur cette question : Barril (N. W.) [10], Groenewege [55], Quastel [102], Bach (D.) [6-7], conduisent à considérer tout autrement le phénomène.

(1) Le papier réactif au-dessus du milieu de culture étant d'environ 5 à 6 cm., les quatre croix indiquent un noircissement sur une hauteur d'environ 4 cm.; les autres croix sont également proportionnelles à la hauteur de la réaction.

En anaérobiose, la dénitrification n'est pas une fermentation : c'est une respiration aux dépens de l'oxygène du nitrate et, par voie de conséquence, une simple réaction de réduction de ce nitrate.

Cette question a retenu assez longtemps notre attention, et nous l'avons étendue aux trois germes étudiés par Combe [36].

Action sur les Nitrates en vie aérobie. (A 22°-25°)

	Milieux Lasseur au Fer en cloches nitrates à 0,50 % pH = 5,8 et pH = 7					Bouillon en cloche nitraté à 0,50 % pH = 7,6					Eau peptonée en cloche nitratée à 0,50 % pH = 7,2				
	Gaz.					Gaz.					Gaz.				
	30 h.	60 h.	4 j.	6 j.	10 j.	30 h.	60 h.	4 j.	6 j.	10 j.	30 h.	60 h.	4 j.	6 j.	10 j.
<i>S. marcescens.</i>	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
<i>S. kiliensis.</i> ...	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
<i>S. essayana.</i> ...	O	O	O	O	O	+++	+++	+++	+++	+++	O	+	+	+	+
Souche A. J...	O	O	O	O	O	+++	+++	+++	+++	+++	O	+	+	+	+
Souche L. L...	O	O	O	O	O	+	++	++	++	++	O	+	+	+	+
Présence de Nitrites dans tous les tubes.															

Action sur les Nitrates en vie anaérobie.

(A 22°-25° et à 35°)

Tubes de cultures bouchés à la lanoline selon la technique de Pascal.

	Milieu Lasseur au Fer nitraté à 0,50 % pH = 5,8				Eaux peptonées nitratées à 0,50 % pH = 5,8 et pH = 7,2			
	Gaz.				Gaz.			
	48 h.	4 j.	6 j.	10 j.	48 h.	4 j.	6 j.	10 j.
<i>S. marcescens.</i>	O	O	O	O	O	O	O	O
<i>S. kiliensis.</i> ...	O	O	O	O	O	O	O	O
<i>S. essayana.</i> ...	O	O	O	O	+	+	+	+
Souche A. J...	O	O	O	O	+	+	+	+
Souche L. L...	O	O	O	O	+	+	+	+
Présence de Nitrites dans tous les tubes.								

Ces résultats appellent plusieurs conclusions.

1° Comme nous l'avons déjà indiqué, nous ne pensons pas que les germes du genre *Serratia* doivent être considérés comme des *aérobies stricts*.

Si la culture en anaérobiose sur milieu Lasseur I n'est pas apparente, la présence de nitrites est tout de même le témoignage d'une certaine activité microbienne.

On connaît d'ailleurs la carence des milieux chimiquement définis pour la vie anaérobie. Il n'y a pas parallélisme entre la qualité de donateur d'hydrogène et la qualité d'aliment en vie anaérobie et on ne se l'explique pas toujours.

2° On ne s'explique pas non plus pourquoi en *aérobiose*, sur milieu Lasseur nitraté (acide ou neutre), *S. essayana*, *A. J.* et *L. L.* ne dégagent pas de gaz.

Nous rappellerons que les cultures de *A. J.* et *L. L.* sur ce milieu évoluent vers l'acidité, alors qu'en eau peptonée elles vont vers l'alcalinité. Il faut donc s'attendre à des phénomènes biologiques différents. Peut-être la toxicité de N_2O formé, sur ces milieux devenus acides ($\text{pH} < 6$), suffit-elle à inhiber le développement ultérieur de la culture?

3° Tous les germes du genre *Serratia* se sont pas des *dénitrifiants indirects*.

S. marcescens et *S. kiliensis* le sont incontestablement. Mais *S. essayana*, *A. J.* et *L. L.* dégagent de l'azote en eau peptonée nitratée, aussi bien qu'en bouillon nitraté, et en anaérobiose comme en aérobiose, doivent être considérés comme des *dénitrifiants directs*.

Action sur les Molybdates.

Le hasard d'expériences nous a amené à étudier l'action de nos germes et ceux de Combe [36] sur les molybdates.

Nous pensons avoir trouvé là un réactif sensible permettant d'apprécier immédiatement le *pouvoir réducteur*.

PROTOCOLE D'EXPÉRIENCE

On utilise des milieux Lasseur I de pH=5,8, *exempts de fer*, auxquels on ajoute du molybdate d'ammoniaque dans la proportion de 2 grammes ‰.

Chaque tube de culture en contient donc : 0 gr. 02.

Le milieu ainsi préparé est absolument incolore. Au cours du développement de la culture, dans le cas d'une réaction positive, on obtient une coloration bleue plus ou moins intense qui traduit la présence de *sous-oxyde de molybdène*, témoignage d'une réduction plus ou moins avancée du molybdate initial.

RÉSULTATS

I. — *En vie aérobie* ⁽¹⁾.

A 22°-25°	24 h.	48 h.	3 jours	4 jours	5 jours	6 jours	8 jours	10 jours
<i>Serratia marcescens</i>	0	0	0	+	+	+	+	+
<i>S. kiliensis</i>	0	0	0	+	+	+	+	+
<i>S. essayana</i>	+	++	+++	+++	++++	++++	++++	++++
<i>Souche A. J.</i>	+	++	+++	+++	++++	++++	++++	++++
<i>Souche L. L.</i>	0	0	0	+	+	+	+	+

(1) Le nombre de croix est proportionnel à l'intensité du phénomène.

II. — *En vie anaérobie.*

1° A 22°-25°, le phénomène est moins rapide et moins net.

2° A 35°, il est plus accentué sans être toutefois aussi intense qu'en vie aérobie.

3° L'addition au milieu Lasseur I d'une trace de peptone (0 gr. 50 ‰) rend les réductions bien plus nettes. Elles s'effectuent dans le sens indiqué ci-dessus. Cela tient sans doute à ce que la peptone augmente le croît microbien en anaérobiose.

CONCLUSION

L'action des cinq germes sur les molybdates permet de mieux apprécier leur pouvoir réducteur que le phénomène de dénitrification, et cela pour plusieurs raisons :

1° Le molybdate n'intervient pas dans le métabolisme bactérien. Il n'y a pas d'assimilation possible du molybdate, comme il y a assimilation du nitrate. Le premier joue uniquement le rôle d'accepteur d'hydrogène.

2° L'apparition de la coloration plus ou moins précoce, et son intensité, variable suivant les germes, au bout d'un temps déterminé, permettent de chiffrer immédiatement l'activité du phénomène.

3° Comme les molybdates ne peuvent probablement pas être métabolisés par les bactéries, nous pensons mettre bien en évidence l'existence d'une véritable dés-

hydrogénase qui n'est pas produite d'une façon égale par les cinq germes.

A cet égard ces bactéries se classent ainsi par ordre décroissant d'activité :

a) Souche A. J. et *Serratia essayana*.

b) Souche L. L.

c) *S. kiliensis* et *S. marcescens*.

REMARQUES

1° En eau peptonée pure cette réaction n'est pas aussi évidente qu'en milieu Lasseur sans fer.

2° Elle est absolument nulle avec le milieu Lasseur au fer.

3° Elle est également gênée par l'addition de nitrate à un milieu sans fer.

Il est vraisemblable que l'action oxydante de ces substances (fer ou nitrate) vient neutraliser celle de la dés-hydrogénase.

Action sur les matières colorantes.

1° En eau peptonée ou bouillons sucrés *ournesolés*, que le milieu ait fermenté ou non, on s'aperçoit, au bout d'un temps plus ou moins long, de la décoloration totale du réactif indicateur.

C'est encore le résultat des *réductions* produites au sein du milieu de culture.

2° Avec le *bleu de méthylène* ajouté au milieu Lasseur sans fer, le pouvoir réducteur s'exerce sur ce produit

comme sur le molybdate d'ammoniaque, en suivant une marche parallèle. Toutefois, il paraît un peu plus rapide en anaérobiose qu'en aérobiose. Cela tient sans doute à la facilité d'oxydation du bleu de méthylène; en effet, dans les tubes décolorés en aérobiose, la partie supérieure, immédiatement au contact de l'air, reste toujours teintée de bleu.

**Action sur la matière colorante sécrétée,
dite : Prodigiosine.**

Nous verrons dans la seconde partie de ce travail que le mécanisme de la pigmentation est rempli de points obscurs.

Avec les deux germes que nous avons étudiés et sans préjuger des réactions réelles qui peuvent se produire, nous croyons bon de noter les faits suivants relatifs au pigment :

1° La souche *A. J.*, qui pigmente en général très bien sur sérum de bœuf coagulé et sur gélose, n'a jamais pigmenté sur milieu Lasseur I, ou du moins d'une façon insignifiante.

2° Avec *A. J.* lorsqu'il a pigmenté faiblement, et même parfois avec *L. L.*, nous avons vu, sur milieu Lasseur I, le pigment pâlir et prendre une teinte jaune sale.

Nous discuterons plus loin ces deux phénomènes.

CHAPITRE VI

Résistance aux antiseptiques. Variations morphologiques provoquées par la présence d'antiseptiques.

Nous avons dit précédemment ce que nous pensions de la fixité de la forme et nous avons montré que même les milieux courants pouvaient modifier dans une proportion plus ou moins grande l'aspect des germes.

La définition de la forme nécessite donc au préalable la définition du milieu.

Si l'on s'écarte des conditions usuelles de culture et que l'on se place volontairement dans des conditions défavorables (en présence d'antiseptiques, par exemple), les modifications seront plus profondes et nous obtiendrons fréquemment des formes d'involution.

La description de ces formes et leur comparaison sera un nouveau moyen de séparer des germes qui, en culture normale, ont de nombreux points communs tant au point de vue morphologique que biologique.

Nous avons effectué cette étude pour nos deux germes et l'avons étendue à *Serratia marcescens*, *S. kiliensis*, et *S. essayana*.

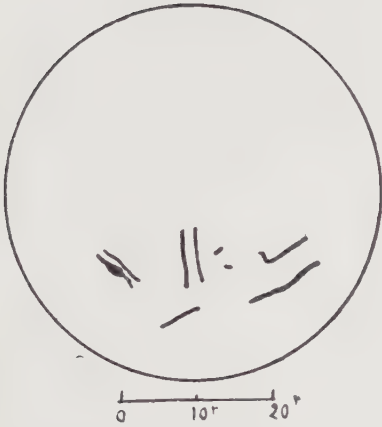
Nous aurions pu, pour chaque microbe, décrire les différentes phases par lesquelles il passe au cours de la culture, en présence de divers antiseptiques. Nous avons craint que la lecture d'un tel exposé ne fût fastidieuse.

Résistance aux Antiseptiques.

Culture en eau peptonée, 2 % — pH = 7,2, additionnée de divers antiseptiques. — Résultats notés après 4 jours de culture à la température de 20°-22°.

	<i>S. marcescens.</i>			<i>S. kitensis.</i>			<i>S. essayana.</i>			Souche <i>A. J.</i>			Souche <i>L. L.</i>		
	Dose Dysgénésique	Dose Antigénétique	Dose Antibiotique	Dose Dysgénésique	Dose Antigénétique	Dose Antibiotique	Dose Dysgénésique	Dose Antigénétique	Dose Antibiotique	Dose Dysgénésique	Dose Antigénétique	Dose Antibiotique	Dose Dysgénésique	Dose Antigénétique	Dose Antibiotique
Acide phénique.....	1°/oo	2°/oo	2,2°/oo	1°/oo	1,5°/oo	2°/oo	1°/oo	1,5°/oo	1,7°/oo	1,5°/oo	2°/oo	2,5°/oo	1°/oo	2°/oo	2,2°/oo
Résorcine.....	1°/oo	2°/oo	2,2°/oo	3°/oo	3,5°/oo	4°/oo	3°/oo	3,5°/oo	4°/oo	3,5°/oo	4°/oo	> 5°/oo	3°/oo	4°/oo	> 5°/oo
Tribromophénol.....	0,18°/oo	0,25°/oo	0,40°/oo	0,18°/oo	0,25°/oo	0,50°/oo	0,18°/oo	0,25°/oo	0,50°/oo	0,18°/oo	0,25°/oo	0,30°/oo	0,18°/oo	0,25°/oo	0,50°/oo
Acide salicylique.....	0,25°/oo	0,50°/oo	0,70°/oo	0,50°/oo	1°/oo	1,25°/oo	0,50°/oo	1°/oo	1,25°/oo	0,50°/oo	1°/oo	1,5°/oo	0,50°/oo	1°/oo	1,5°/oo
Salicylate de soude....	3°/oo	3,5°/oo	4°/oo	3,5°/oo	4°/oo	> 5°/oo	3,5°/oo	3,5°/oo	5°/oo	5°/oo	> 5°/oo	> 5°/oo	5°/oo	> 5°/oo	> 5°/oo
Acide borique.....	1,25°/oo	2°/oo	2,2°/oo	2°/oo	2,5°/oo	3°/oo	2°/oo	4°/oo	4,5°/oo	3,5°/oo	4°/oo	> 5°/oo	5°/oo	> 5°/oo	> 5°/oo
Borate de soude.....	1,5°/oo	2°/oo	3°/oo	4,5°/oo	> 5°/oo	> 5°/oo	3°/oo	3,5°/oo	4°/oo	4°/oo	4,5°/oo	> 5°/oo	5°/oo	> 5°/oo	> 5°/oo
Fluorure de sodium...	5°/oo	6°/oo	10°/oo	10°/oo	> 10°/oo	> 10°/oo	10°/oo	> 10°/oo	> 10°/oo	10°/oo	> 10°/oo	> 10°/oo	10°/oo	> 10°/oo	> 10°/oo
Fluorure d'argent....	0,015°/oo	0,03°/oo	0,04°/oo	0,03°/oo	0,04°/oo	> 0,07°/oo	0,03°/oo	0,04°/oo	> 0,07°/oo	0,03°/oo	0,04°/oo	> 0,07°/oo	0,03°/oo	0,04°/oo	> 0,07°/oo
Fluosilicate de zinc...	0,03°/oo	0,10°/oo	0,15°/oo	0,40°/oo	0,6°/oo	0,8°/oo	0,03°/oo	0,10°/oo	0,15°/oo	0,03°/oo	0,10°/oo	0,15°/oo	0,03°/oo	0,10°/oo	0,15°/oo
Sulfite neutre de Na.	4°/oo	5°/oo	5,5°/oo	4°/oo	5°/oo	> 5°/oo	4°/oo	5°/oo	> 5°/oo	4°/oo	5°/oo	> 5°/oo	4°/oo	5°/oo	> 5°/oo
Bisulfite de potasse...	1,2°/oo	1,5°/oo	1,7°/oo	1,2°/oo	2°/oo	> 2°/oo	1,5°/oo	2°/oo	2,5°/oo	2,4°/oo	2,5°/oo	> 1,5°/oo	1,5°/oo	2°/oo	> 2,5°/oo
Acide tartrique.....	1,2°/oo	1,4°/oo	1,5°/oo	1,2°/oo	1,4°/oo	1,5°/oo	0,8°/oo	1°/oo	1,2°/oo	1,2°/oo	1,4°/oo	1,5°/oo	1,2°/oo	1,4°/oo	1,5°/oo
Acide malique.....	0,6°/oo	0,8°/oo	1°/oo	0,8°/oo	1°/oo	1,25°/oo	0,8°/oo	1°/oo	1,3°/oo	1,2°/oo	1,4°/oo	1,5°/oo	0,8°/oo	1°/oo	1,25°/oo

Acide Phénique.

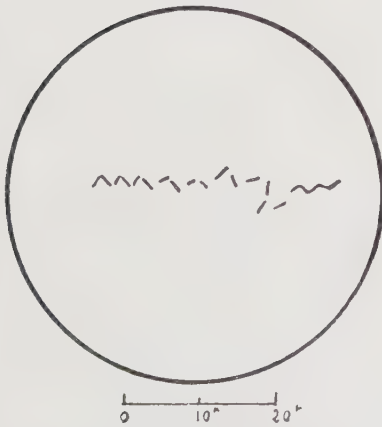


S. killiensis { Le 3^e jour avec :
 { Eau peptonée : 2 ‰.
 { Acide phénique : 1 ‰.



S. essayana { Le 3^e jour avec :
 { Eau peptonée : 2 ‰.
 { Acide phénique : 1 ‰.

Tribromophénol.



S. marcescens { Après 48 heures avec :
 { Eau peptonée : 2 ‰.
 { Tribromophénol : 0.18 ‰.



S. killiensis { Après 24 heures avec :
 { Eau peptonée : 2 ‰.
 { Tribromophénol : 0.18 ‰.

Acide Borique.



0" 10" 20"

Souche A. J. { Le 3^e jour avec :
Eau peptonée : 2 ‰.
Acide borique : 3,5 ‰.



0" 10" 20"

Souche L. L. { Après 48 heures avec :
Eau peptonée : 2 ‰.
Acide borique : 5 ‰.

Borate de Soude.



0" 10" 20"

S. kiliensis { Le 3^e jour avec :
Eau peptonée : 2 ‰.
Borate de soude : 4,5 ‰.



0" 10" 20"

Souche A. J. { Le 4^e jour avec :
Eau peptonée : 2 ‰.
Borate de soude : 3 ‰.

Dans le tableau ci-contre, nous donnons les doses dysgénésiques auxquelles chacun des germes a été soumis. Ce sont, en général, les doses les plus voisines de la dose antigénétique. Parallèlement nous indiquons les doses antigénétiques et approximativement les doses antibiotiques ⁽¹⁾.

Des planches annexes figurent les variations morphologiques les plus originales.

Résultats généraux des expériences.

I. — Le *Fluorure de sodium* ne doit pas être considéré comme un *antiseptique*. Tous nos germes en supportent la présence à la dose de 5 à 10 grammes par litre, et même plus.

II. — Les antiseptiques permettent de distinguer des germes qui, sur milieux normaux, se comportent d'une façon semblable :

1° Par leur résistance à telle ou telle dose d'antiseptique.

2° Par leurs variations morphologiques au cours de la culture. L'espèce *Serratia marcescens*, par exemple, n'est pas aussi apte à donner des formes allongées que les espèces *S. essayana* et *S. kiliensis*.

S. kiliensis et *S. essayana* qui, dans la plupart des cas, ont été les plus sensibles quant à l'allongement, se sont laissé dépasser par les souches *L. L.* et *A. J.* en présence d'*acide borique*.

(1) Pour ces déterminations, nous n'avons pas suivi exactement les méthodes rigoureuses de J. Régnier et S. Lambin, mais plutôt la méthode simplifiée qu'avait employée Combe dans son étude de l'action de l'acide phénique sur ses trois *Serratia*.

III. — Un corps, parce qu'il est antiseptique, n'agit pas forcément sur la forme des germes. Nous en avons la preuve :

Avec le *fluosilicate de zinc*, pour tous les germes.

le *bisulfite de potassium* pour tous les germes, sauf *S. essayana*.

le *bromophénol* et le *sulfite neutre de sodium*, pour les souches *A. J.* et *L. L.*

le *fluorure d'argent*, pour tous les germes, sauf *S. marcescens*.

IV. — Si l'on considère l'antiseptique seul, il y a lieu d'envisager son action de plusieurs manières, par rapport à la culture et par rapport au germe.

A. — La culture pourra être nettement retardée bien que la dose d'antiseptique ne soit pas antigénétique. C'est le rôle :

1° Du <i>phénol</i> (phase de latence : 12 heures).	} Pour <i>S. mar-</i> <i>cescens</i> .
De la <i>résorcine</i> (phase de latence : 3 jours).	
Du <i>bromophénol</i> (phase de latence : 36 h.).	
De l' <i>acide salicylique</i> (phase de latence : 3 jours).	
Du <i>borate de soude</i> (phase de latence : 3 jours).	

2° Du *salicylate de soude* (bien qu'il ne soit pas très puissant antiseptique) (phase de latence : 36 h. à 48 h.), pour tous les germes.

3° De l'*acide borique* et du *borate de soude* (phase de latence : 36 h. à 48 h.) pour *A. J.* et *L. L.*

B. — L'action de l'antiseptique sur les cellules microbiennes pourra être précoce ou accompagnée d'un léger retard.

1° On constate l'action précoce (c'est-à-dire au bout de 24 heures) :

Avec l'acide phénique, sur *S. essayana*.

le sulfite neutre de sodium, sur *S. marcescens*,
S. kiliensis, *S. essayana*.

l'acide borique et le borate de soude sur *S. kiliensis* et surtout sur *S. essayana*.

2° L'action tardive se manifeste dans tous les autres cas. Les germes allongés ne se montrent que dans des cultures parvenues à un certain âge, et en général, mieux les 2° et 3° jours que le 4° jour.

C. — L'action de l'antiseptique sur la morphologie proprement dite pourra être envisagée de différentes façons :

1° Action dans le sens de la longueur (*Formes allongées*).

2° Action dans le sens de la largeur (*Formes gonflées*).

3° Action faible ou indifférente (*Formes normales ou à peu près normales*).

4° Action sur la disposition ou le groupement des germes.

5° Action sur la structure même de la cellule microbienne.

1° *Formes allongées*.

S. marcescens, avec : sulfite neutre de sodium

(3^μ, 5^μ, 8^μ).

acide tartrique, acide malique

(3^μ, 5^μ, 8^μ).

un peu bromophénol et fluorure
d'argent (2^μ à 3^μ).

S. kiliensis, avec : phénol ($2^{\mu}2$ à $3^{\mu}8$) (quelques rares de 8^{μ} à 10^{μ}).

bromophénol (15^{μ} à 20^{μ}).

acide salicylique (3^{μ} à 8^{μ}).

salicylate de soude (3^{μ} à 4^{μ}).

acide borique (5^{μ} à 8^{μ}).

borate de soude (15^{μ} à 20^{μ}).

sulfite neutre de sodium (7^{μ}).

acide tartrique (3^{μ} à 5^{μ}).

acide malique (7^{μ} à 15^{μ}).

S. essayana, avec : phénol (7^{μ} à 9^{μ} les 1^{res} heures, puis 20^{μ} à 30^{μ}).

résorcine (?) (rares bacilles de 4^{μ} à 5^{μ}).

bromophénol (13^{μ} à 16^{μ}).

acide salicylique (7^{μ} à 15^{μ}).

salicylate de soude (types de 3^{μ} à 4^{μ} ; types plus rares de 25^{μ}).

acide borique (types de 4^{μ} , types de 10^{μ}).

borate de soude (25^{μ} à 30^{μ}).

sulfite neutre de sodium (6^{μ} à 10^{μ}).

acide tartrique (types de 3^{μ} à 6^{μ} , types de 10^{μ}).

acide malique (types de 3^{μ} à 8^{μ} , types de 10^{μ} à 12^{μ}).

A. J., avec : salicylate de soude (3^{μ} à 8^{μ}).

acide borique (20^{μ}).

borate de soude (30^{μ} à 40^{μ}).

L. L., avec : phénol (le 3^e et le 4^e jour, quelques types de 16^μ à 32^μ, et quelques types de 30^μ à 50^μ).

résorcine (?) le 3^e et le 4^e jour, rares éléments de 4^μ à 8^μ).

salicylate de soude (?) (rares éléments de 3^μ à 4^μ).

acide borique (14^μ à 20^μ, un de 100^μ).

borate de soude (4^μ à 10^μ).

2° *Formes gonflées.*

Cette action est parfois conjuguée avec l'action dans le sens de la longueur.

S. marcescens, avec fluorure d'argent.

S. kiliensis, avec phénol (début de culture), résorcine.

S. essayana, avec résorcine (début de culture).

A. J., avec phénol, résorcine, acide salicylique, acide tartrique (?) et acide malique (?).

L. L., avec phénol (début de culture), résorcine (début de culture), acide salicylique et salicylate de soude (début de culture), acide tartrique (?) et acide malique (?).

3° *Formes normales ou à peu près normales.*

S. marcescens, avec phénol, résorcine, acide salicylique, salicylate de soude, acide borique, borate de soude, fluorure de sodium, fluosilicate de zinc.

S. kiliensis et *S. essayana*, avec fluorure d'argent, fluosilicate de zinc, bisulfite de potassium, fluorure de sodium.

A. J. et *L. L.*, avec bromophénol, fluorure de sodium, fluosilicate de zinc, fluorure d'argent, sulfite de sodium, bisulfite de potassium.

4° *Groupement des germes.*

- a) Groupements analogues à ceux des Staphylocoques : *S. marcescens* et *A. J.*, avec acide salicylique.
- b) Groupements en amas de petits bacilles agglutinés : *A. J.* et *L. L.* avec fluorure d'argent.
- c) Groupements spirilliformes :
 - S. marcescens*, avec bromophénol.
 - S. essayana*, avec bisulfite de potassium.
 - A. J.*, avec acide malique.
- d) Dans le cas d'allongements : bactéries s'entrecroisant pêle-mêle, incurvées, recourbées sur elles-mêmes :
 - S. kiliensis*, avec bromophénol, borate de soude.
 - S. essayana*, avec acide phénique, borate de soude, acide tartrique, acide malique.
 - A. J.* et *L. L.*, avec acide borique, borate de soude.

5° *Action sur la structure de la cellule microbienne.*

La culture, en milieux additionnés de substances chimiques, antiseptiques ou non, modifie certainement la constitution de la cellule microbienne. Les colorants peuvent n'être plus retenus de la même façon. C'est ainsi qu'avec le *fluorure de sodium*, tous nos germes ont montré une *vacuole* très nette, en présence de fuchsine diluée⁽¹⁾.

C'est un détail qu'aucun autre produit ne nous a révélé, sauf le sulfite neutre de sodium pour *S. marcescens*.

(1) Fuchsine..... 0 gr. 10
Alcool à 90°..... 1 cm³.
Eau distillée..... 100 cc.

En résumé, nous avons constaté que différents anti-septiques, par leur action sur la morphologie, peuvent aider à séparer des espèces très voisines. Chaque bactérie subit une influence particulière et réagit dans un sens déterminé.

Toutefois, certaines ont subi des variations presque parallèles.

Nous pouvons rapprocher :

S. kiliensis et *S. essayana*.

A. J. et *L. L.*

S. marcescens s'est tenu bien à part.

Ce rapprochement, au point de vue morphologique, perd sa valeur, comme nous l'avons vu, dans le domaine biologique.

Nous verrons également qu'il ne faut plus le considérer dans le domaine sérologique.

CHAPITRE VII

Pouvoir pathogène. Caractères sérologiques.

§ I. — Pouvoir pathogène.

Généralités :

La pathogénie de *Serratia marcescens* a seule été étudiée. On ne s'est pas occupé autant de celle de *S. kilien-sis*, ni de celle de *S. essayana*.

C'est que, jusqu'ici, on a considéré les *Prodigiosus* comme des saprophytes banaux sans danger pour l'homme.

Pourtant, si l'on relit les travaux de Roger (1889) [106 à 108] et de Bertarelli [16-17], on en déduit qu'il ne faut peut-être pas tirer une conclusion aussi nette et aussi hâtive.

Roger [106 à 108] montre le rôle de *S. marcescens* associé avec le virus du charbon symptomatique. L'un ou l'autre de ces microbes, injecté isolément au Lapin, ne provoque pas de troubles appréciables. Mais, si l'on associe les deux, la réceptivité du Lapin est accrue et le charbon évolue.

Des résultats semblables sont obtenus par Maillard [122], Vincent [124] et Rouget [111], en 1892, en associant, chez le Lapin, *S. marcescens* et des spores tétaniques.

Besson [19], en 1895, obtient des résultats comparables

chez le Cobaye et le Lapin avec des spores de *Vibrio* septique, lavées, associées à *S. marcescens*.

On peut donc conclure que *S. marcescens* abolit l'immunité vis-à-vis d'autres microbes.

Bertarelli [16-17] tire de ses travaux les conclusions suivantes :

1° L'injection de *S. marcescens* n'est effectivement pathogène que pour un certain nombre d'animaux qui sont par ordre de sensibilité croissante : le Lapin, le Cobaye, le Rat, la Souris.

2° Les passages par l'animal n'augmentent pas l'action pathogène ; seul, dans ces conditions, le pouvoir chromogène est accru et la forme en coccus disparaît en partie.

3° Le pouvoir pathogène des vieilles souches est plus élevé que celui des jeunes.

4° Les cultures mortes sont aussi actives que les cultures vivantes.

5° Parmi les différents modes d'inoculation utilisés, l'injection intraveineuse s'est montrée la plus active.

6° Les produits solubles extraits des corps microbiens ne sont pas toxiques, mais contiennent une substance hémolytique agissant seulement sur les globules rouges du Cobaye et pas sur ceux du Lapin.

7° La toxicité est due aux corps microbiens eux-mêmes.

En 1900, Marx [93] réalise quelques expériences qui font considérer *S. marcescens* comme pathogène pour la Grenouille.

En 1935, Masero Enrico [95] étudie le pouvoir pathogène du *Bacillus prodigiosus* isolé des chenilles du

Tenebrio molitor, et mortes par suite de l'action de divers champignons entomophytes. Ce bacille n'est pas pathogène pour les chenilles, et cette immunité naturelle pourrait résulter de ce que les aliments absorbés par ces chenilles le renferment normalement.

En 1935, M. Eiser et Jacobsohn [48] étudient l'action antagoniste des extraits stériles du *B. prodigiosus*. Les centrifugats, même chauffés 1/2 heure à 70°, empêchent la croissance de divers échantillons de *B. diphtériques*, *B. pseudo-diphtériques*, *Gonocoques*, *Staphylocoques*, *Pneumocoques*.

Cet effet antagoniste est faible vis-à-vis du *B. typhique*, *B. coli*, *B. de Shiga*, *B. subtilis*, *Streptocoque*.

Les centrifugats dilués cessent d'être inhibiteurs, mais provoquent le développement en amas.

Par l'emploi d'une technique particulière (gélose recouverte de cellophane), ces auteurs montrent que le *B. prodigiosus* sécrète véritablement une substance inhibitrice soluble dans l'eau. Le pigment rouge est inactif.

En 1936, M^{lles} M. Aïtoff [4], M. Dion [4], et H. Dobkevitch [4], isolent des crachats d'un malade atteint de pneumonie, une culture pure de *B. prodigiosus*, pathogène, par ordre de sensibilité croissante, pour la Souris, le Rat, le Cobaye, le Lapin.

Elles mettent en évidence des toxines microbiennes très actives, à l'aide de la réaction dite de Schwartzmann.

C'est une réaction hémorragique d'hypersensibilité provoquée par les filtrats (toxines microbiennes) injectés dans le derme du Lapin, injection suivie, 24 heures après, d'une nouvelle injection de la même toxine dans les

veines. L'endothélium des capillaires sanguins du derme, sensibilisé par la première injection, éclate sous l'influence de l'injection intraveineuse, donnant lieu à une hémorragie en nappe de toute la région sensibilisée.

Avec leur *B. prodigiosus*, ces auteurs ont observé l'apparition du piqueté hémorragique au moment où elles finissaient l'injection intraveineuse.

En 1936, M^{lle} Paraschivesco [99] travaillant dans le laboratoire de Boisvin et Mesrobeanu [27], et utilisant leur méthode d'extraction des « *antigènes somatiques complets* », démontre que l'antigène somatique du *B. prodigiosus* est de faible toxicité. Toutefois, on doit noter son caractère entérotropique très net.

En 1936, Guy Bruynoghe [31] ayant isolé 4 souches de *B. prodigiosus* (2 de l'eau, — 1 d'un lait — et 1 d'un cadavre d'animal), identiques morphologiquement et au point de vue de leur développement sur divers milieux, montre que ces souches diffèrent quant à leur pouvoir agglutinant.

En 1937, V. Sertic [116] envisage les lysines diffusibles sécrétées par des *prodigiosus-phages*.

En 1937, P. Lepesme [86] signale la virulence du *B. prodigiosus* pour le Criquet Pèlerin (*Schistocerca gregaria*).

1° L'inoculation dans la cavité générale a entraîné la mort en l'espace de quelques heures à quelques jours.

2° L'ingestion des mêmes cultures n'a provoqué la mort qu'accidentellement.

3° La virulence n'a nullement été exaltée par passages successifs sur les Criquets.

Expériences avec la souche A. J.

Lorsque nous avons isolé notre germe de la bouche du malade atteint de diphthérie, nous l'avons injecté *sous la peau* d'un Lapin. L'animal est mort au bout de 13 jours avec les phénomènes suivants : perte de l'appétit, diarrhée, paralysie du train postérieur. Au point d'inoculation, un abcès s'était formé, chargé d'un pus très épais et *légèrement rosé*.

Nous avons vérifié ce pouvoir pathogène sur Souris, sur Cobayes, sur d'autres Lapins.

Nous avons injecté à ces différents animaux des émulsions de cultures jeunes sur gélose, dosées à environ 340.000.000 de germes par cm^3 d'eau physiologique ⁽¹⁾.

Sur souris (injections sous-cutanées) :

1 ^{er} Lot :	Poids des animaux.	Dose injectée.	Résultats.
	16 grammes	$1/4 \text{ cm}^3$	Vit.
	18 —	$1/2 \text{ cm}^3$	Mort au bout de 11 heures
	19 —	$3/4 \text{ cm}^3$	— de 10 heures
	20 —	1 cm^3	— de 10 h. $1/4$
	20 —	$1 \text{ cm}^3 \ 1/2$	— de 9 heures
	23 —	2 cm^3	— de 8 h. $3/4$.
2 ^e Lot :	14 grammes	$1/4 \text{ cm}^3$	Vit.
	16 —	$1/2 \text{ cm}^3$	Mort au bout de 10 h. $1/2$
	19 —	$3/4 \text{ cm}^3$	— de 11 heures
	24 —	1 cm^3	— de 10 h. $1/2$.

DESCRIPTION DES PHÉNOMÈNES OBSERVÉS.

C'est en général au bout de 6 à 7 heures que l'animal se sent malade. Il est ramassé sur lui-même, le poil un peu hérissé, de la tête au milieu du dos. Il est chaud au

(1) Technique Régnier, à l'aide de la levure de boulanger.

toucher et ne s'enfuit pas au contact des doigts comme les autres animaux bien portants. Les yeux sont larmoyants. Les urines s'évacuent et il y a un peu de diarrhée. Dans les heures qui suivent, on note de la paralysie, localisée surtout au train postérieur. L'animal étant mis sur le dos, les pattes se raidissent et s'agitent faiblement, mais ne peuvent l'aider à se redresser. La sensibilité n'est pas abolie: il réagit à une faible piqure de la queue par quelques soubresauts du corps sans pouvoir proférer un cri.

Sur Cobayes (injections périlonéales) :

	Dose injectée.	Résultats.
Cobaye de 320 grammes.....	2 cm ³	Mort au bout de 56 h.
— 350 —	5 cm ³	— de 10 h.
— 370 —	5 cm ³	— de 10-12 h.
— 690 —	5 cm ³	— de 10-12 h.

Sur Lapins (injections intraveineuses) :

Lapin de 280 grammes.....	1 cm ³	Mort au bout de 10 heures
— 440 —	2 cm ³	— de 12 heures
— 650 —	2 cm ³	— de 16 heures
— 760 —	2 cm ³	— de 26 heures

DESCRIPTION

DES PHÉNOMÈNES OBSERVÉS CHEZ CES ANIMAUX.

1° Quelques heures après l'injection, les animaux montrent un œil inquiet; puis, il se recroquevillent, cherchent un coin dans leur cage et s'y blottissent la tête cachée dans ce coin. Ils n'acceptent aucune nourriture. Des frissons les agitent de temps en temps. Les membres postérieurs sont nettement paralysés. La diarrhée est

légère. Un état de somnolence et de torpeur précède la mort.

2° A l'autopsie, le foie et la rate sont congestionnés avec de petites taches blanches purulentes. Le pus ensemené donne des colonies rouges caractéristiques. Le sang est toujours plein de microbes vivants et très mobiles.

Expériences avec la souche L. L.

Ce microbe n'a été essayé que sur Souris. Nous avons obtenu des résultats comparables à ceux obtenus avec la souche A. J.

Observations sur la pathogénie des germes.

1° Les injections sous-cutanées faibles provoquent toujours un abcès au point d'inoculation. On peut en retirer un pus très épais qui, ensemené, donne des colonies à pigmentation caractéristique.

2° Des émulsions de germes vivants mélangées à des aliments (lait, graines) et ingérées par l'animal ne provoquent pas de désordres sensibles. On note tout au plus un peu de diarrhée.

3° Les germes chauffés, soit 1/4 d'heure à 100°, soit 1/2 heure à 55°, deviennent inoffensifs, même en injection intraveineuse.

4° Le pouvoir pathogène n'est pas lié à la fonction chromogène. Pour les Souris, les cultures incolores sont aussi toxiques que les cultures pigmentées.

5° Les passages successifs sur animaux ne nous ont pas paru exalter le pouvoir pathogène, ni le pouvoir chromogène.

6° On sait que les *exotoxines* ne se forment qu'au bout d'un temps plus ou moins long de culture. Nous les avons recherchées dans les cultures en eau peptonée de la souche *A. J.*, filtrées sur bougie L₅ et expérimentées sur Souris.

				Dose de filtrat injectée.	Résultats.
Filtration après 56 heures de culture.	Souris de 14 grammes.			1 cm ³	Vit.
— 4 jours —	— 14 —			2 cm ³	Vit.
— 8 jours —	— 17 —			2 cm ³	Mort après 34 h.
— 15 jours —	— 17 —			2 cm ³	Mort après 12 h.
— 23 jours —	— 16 —			2 cm ³	Mort après 12 h.
— 30 jours —	— 17 —			2 cm ³	Vit.

De cette expérience, nous tirons les conclusions suivantes :

a) Du 1^{er} au 6^e jour les produits de transformation du milieu de culture sont sans action sur l'animal. Il faut la présence du microbe pour provoquer un phénomène d'ordre pathogène.

b) Nous avons mis en évidence la sécrétion d'une *exotoxine* dont l'activité peut être représentée par une courbe, le maximum existant le 8^e et le 23^e jour pour disparaître vers le 30^e jour.

c) Nous pensons qu'il est nécessaire de faire une distinction entre la toxicité de cette *exotoxine* et celle du germe lui-même. Dans les cultures du 8^e au 23^e jour, elle vient ajouter son action à celle du microbe. C'est peut-être ce qui faisait dire à Bertarelli [17] que « le pouvoir pathogène des vieilles souches est plus élevé que celui des jeunes ».

7° Ayant ainsi démontré que la part principale de la virulence revenait à la cellule bactérienne, nous avons

essayé d'en extraire l'*endotoxine*, selon les méthodes de A. Boisvin et L. Mesrobian [27]. Mais les résultats que nous avons obtenus jusqu'ici ne sont pas assez précis pour que nous les considérions comme définitifs.

Cependant, des Souris ayant reçu en injections intrapéritonéales 0 cm³ 5 d'extrait neutralisé (*contenant l'endotoxine*) sont devenues malades aussitôt et sont mortes au bout de 8 heures.

RÉSUMÉ

De ces faits examinés en bloc, on est en droit de déduire que la souche *A. J.*, et vraisemblablement les germes qui en sont voisins, sont pathogènes à condition toutefois que la concentration soit suffisante.

Les petites doses ne produisent en apparence aucun désordre grave. L'animal est inquiet, frissonnant, tremblant pendant quelques heures, mais il se rétablit.

§ II. — Caractères sérologiques.

L'étude morphologique et biologique de nos deux germes a montré tous leurs points communs.

Il reste à voir s'il n'existe pas entre eux une « *parenté humorale* » et jusqu'à quel degré elle peut être observée.

Nous avons étendu la comparaison à *Serratia marcescens*, *S. kiliensis*, *S. essayana*. Nous nous sommes servi des sérums de la souche *A. J.* et de la souche *L. L.* que nous avons obtenus à partir du Lapin.

Les injections aux animaux ont été effectuées en suivant la technique décrite par Combe [36]. Toutefois, nous avons fait suivre les injections intrapéritonéales,

d'injections intraveineuses, soit en tout : 12 à 16, la dernière consistant en 5 cm³ d'une émulsion de germes vivants.

Les germes soumis à l'agglutination ont été émulsionnés dans l'eau physiologique, lavés trois fois et remis en suspension homogène. 1 cm³ de cette émulsion a été versé dans de petits tubes à hémolyse et mis en contact avec 1 cm³ de sérum à différentes dilutions.

Nous avons noté après 4 heures d'étuve à 37° les agglutinations-limite, visibles à la loupe.

Sérum expérimenté.	Germes soumis à l'agglutination.	Dilution-limite du Sérum donnant une agglutination positive.
SOUCHE A. J....	<i>Serratia marcescens</i>	$\frac{1}{600}$
	<i>S. kiliensis</i>	$\frac{1}{100}$
	<i>S. essayana</i>	$\frac{1}{6.000}$
	<i>Souche A. J.</i>	$\frac{1}{20.000}$
	<i>Souche L. L.</i>	$< \frac{1}{30}$
SOUCHE L. L....	<i>S. marcescens</i>	$\frac{1}{600}$
	<i>S. kiliensis</i>	$\frac{1}{800}$
	<i>S. essayana</i>	$< \frac{1}{30}$
	<i>Souche A. J.</i>	$< \frac{1}{30}$
	<i>Souche L. L.</i>	$\frac{1}{10.000}$

Cet aperçu sérologique, contrôlé par deux expériences, montre des parentés humorales très nettes entre la souche A. J., *S. essayana*, *S. marcescens* et *S. kiliensis*,

d'une part: entre la souche *L. L.*, *S. kiliensis* et *S. marcescens*, d'autre part.

Les souches nouvelles *A. J.* et *L. L.* semblent très éloignées l'une de l'autre. Il serait donc intéressant pour pénétrer davantage l'intimité de ces relations entre nos deux germes et ceux étudiés par Combe [36], d'effectuer la réaction de Castellani. Ce travail devant entraîner l'étude complète du pouvoir antigène de cinq espèces voisines, nous nous réservons d'y revenir ultérieurement.

CHAPITRE VIII

Place des deux microbes dans la classification.

Dans sa classification, Vuillemin [126] définit ainsi le genre *Serratia* : « *Plastides en bâtonnets, pas d'éléments sporifères distincts des bâtonnets végétatifs, foyers diffus* ».

En 1923, puis en 1934, la classification américaine reprend le genre *Serratia* avec cette définition : « *Petits bâtonnets aérobies produisant un pigment rouge ou rose sur agar et sur gélatine* ».

Puisque nos germes possèdent les caractères du genre *Serratia*, au sens de Vuillemin [126] et au sens des Américains, nous pensons que le nom générique *Serratia* doit leur être appliqué.

Au début de ce travail, nous n'avons pas cru devoir les assimiler aux nombreuses espèces du genre *Serratia* déjà connues. Nous avons noté les caractères essentiels qui les en séparaient.

Elles se distinguent surtout des trois espèces : *S. marcescens*, *S. kiliensis*, *S. essayana*. Cette dernière, quoique n'étant nullement mentionnée dans la 4^e édition (1934) du *Bergey's Manual of determinative Bacteriology*, a cependant été considérée comme une espèce nouvelle par Combe [36], en 1933.

C'est parce que ces trois microbes ont été étudiés et revus tout récemment par l'auteur signalé ci-dessus, que nous avons cru nécessaire de les prendre comme témoins, et d'établir sur quelques points des expériences parallèles qui nous ont permis de noter des différences importantes, entre ces germes et les nôtres, au cours de leur étude morphologique et de leur résistance aux antiseptiques, au cours de leur étude biologique et sérologique.

Nous les résumons dans un tableau.

La consultation de ce tableau nous autorise à considérer les souches A. J. et L. L., comme deux espèces nouvelles.

Nous nous proposons d'appeler la souche A. J. : *Serratia gutturis* A. Jan et la souche L. L. : *Serratia stercoraria* A. Jan, ces deux dénominations rappelant le lieu d'origine de chaque microbe.

SERRATIA GUTTURIS, species nova, 1^{re}8 longa, 0^{re}8 lata; 6-8 flagella; super gelosam rubra; in statulis fluidis plerumque colorem remittens, quoniam simul resolvendi magna potestate; muribus musculis; caviis cobayis, cuniculis morbum inferrens.

SERRATIA STERCORARIA, species nova, 1^{re}5 longa, 0^{re}8 lata; 8-10 flagella; super gelosam rosea-rubra; in statulis fluidis semper cum velo spumoso roseo-rubro et resolvendi languida potestate; muribus musculis morbum inferrens.

Principaux caractères différentiels.

	<i>S. marcescens</i>	<i>S. kiliensis</i>	<i>S. essayana</i>	<i>S. gutturis</i>	<i>S. stercoraria</i>
Origine.	très ancienne surtout sur matières amy-lacées.	Eau de Kiel (1888)	Eau d'un puits d'Essey. (1915)	Gorge d'un malade atteint de diphtérie (1933)	Fumier de champi-gnonniste. (1936)
Dimensions.	$L = 1 \mu. 5.$ $l = 0 \mu. 8.$	$L = 1 \mu. 9.$ $l = 0 \mu. 6.$	$L = 2 \mu. 9.$ $l = 0 \mu. 7.$	$L = 1 \mu. 8.$ $l = 0 \mu. 8.$	$L = 1 \mu. 5.$ $l = 0 \mu. 6.$
Foetus.	4.	Diffus.	2 à 6.	6 à 8.	8 à 10.
Culture sur gélose.	Rougeâtre.	Rougeâtre.	Rougeâtre.	Rouge passant souvent au violacé.	Rose-rouge.
Sur gélatine.	Liquéfaction.	Liquéfaction.	Liquéfaction.	Liquéfaction. > qu'avec <i>S. stercoraria</i> .	Liquéfaction.
Sur milieu Lasseur (pH = variés).				Acidité finale entre 5,2 et 5,7.	Acidité finale entre 5,8 et 6,1.
Sur milieu Lasseur (pH = 5,8).	Voile plissé Rouge foncé.	Voile plissé Rouge foncé.	Voile léger teinte rose faible inconstante.	Voile crémeux, le plus souvent achromogène.	Voile crémeux rose-rouge.
Limites de croissance.				80 à 42°	12° à 38°
Action de la température à 37°.				Allongements allant jusqu'à 4 μ à 5 μ .	Allongements jusqu'à 25 μ à 30 μ .
Action des antiseptiques.	Peu de formes allongées.	Formes allon-gées très fréquentes.	Formes allon-gées très fréquentes.	Quelques formes allon-gées.	Formes allon-gées assez fréquentes.
Réduction des Molybdates.	Très faible.	Très faible.	Forté.	Très forte.	Faible.
Actions sur les Glucides (après 48 heures).	Arabinose Xylose : Maltose : + Lactose : 0 Mannite : +			0 0 + 0 +	+ + + + +
Pouvoir pathogène.	Discuté.			Lapin. Cobaye. Souris.	Souris.
Sérologie	Dilution-limite avec sérum <i>S. gutturis</i> .	$\frac{1}{600}$	$\frac{1}{6.000}$	$\frac{1}{20.000}$	$\frac{1}{30}$
	Dilution-limite avec sérum <i>S. stercoraria</i>	$\frac{1}{800}$	$< \frac{1}{30}$	$< \frac{1}{30}$	$\frac{1}{10.000}$

SECONDE PARTIE

Contribution à l'étude du phénomène de chromogénèse.

CHAPITRE I

Généralités.

Le phénomène de chromogénèse n'est pas le moins curieux parmi les manifestations de la vie bactérienne.

Est-il besoin de rappeler combien l'apparition spontanée de couleur rouge sur différentes substances alimentaires : haricots, pain, farine et même sur des hosties a provoqué de stupéfaction et de terreur ?

Bizio (1823) [21-24], Ehrenberg (1848) [46-47], Schrötter (1872) [115], etc..., qui se sont les premiers intéressés à la prodigiosine, ont eu de nombreux émules. L'étude de ce phénomène ne s'est du reste pas limitée au pigment sécrété par le *Bacillus prodigiosus*.

D'autres germes : *B. fluorescens*, *B. pyrocyanus*, *B. violaceus*, *B. aurantiacus*, *B. Le Monnieri*, *B. chlororaphis*, *B. Beijerinck-Dupaix*, etc..., dont l'étude a déjà été très poussée, se sont révélés avec certains caractères parallèles à ceux du *B. prodigiosus*, mais en affectant une prédilection pour une autre couleur, voire même pour le caméléonage.

Des travaux ont été couronnés de succès.

En 1882, Gessard [52] a isolé la *pyocyanine*, pigment bleu du *B. pyocyaneus* et a expliqué son mécanisme de production.

Les Allemands : Rosenberg [110], Amako [5], Bortels [28], Wrede [130], Hettehe [130], etc..., et les Hollandais : Beijerinck [13 à 15], Kögl [70], Postowsky [70], Tönnis [71], sont les auteurs étrangers qui ont apporté la contribution la plus importante à l'étude des pigments bactériens, les uns donnant des procédés d'extraction, les autres des formules de constitution.

En France, depuis 1911, Lasseur [76 à 82] étudie de nombreux germes chromogènes. Il a isolé la *chlororaphine* du *B. chlororaphis*. Par la pratique des cultures au sein de milieux chimiquement définis, il a précisé les conditions nécessaires à l'apparition du pigment.

Dheré (1934) [41] a fait une étude fluoroscopique de la chlororaphine et de ses dérivés, et a montré au cours d'autres travaux que les « *êtres vivants sont capables de former des matières colorantes à noyau de phénazine* ».

D'après Edgard Lederer [85], Karrer et Solmssen (1934-1937) ont constaté que le pigment des microorganismes, *Thiocystis* et *Rhodovibrio*, est un mélange très compliqué de différents caroténoïdes inconnus jusqu'ici, mais qui offrent une grande similitude avec les pigments caroténoïdes de levures rouges *Torula* et ceux du *Lycogala epidendron*.

A côté de cela des points qui intéressent hautement la microbiologie générale ont été débattus :

1° On s'est demandé si la substance qu'est le pigment est une manifestation au plus haut degré de la vie des microbes qui en sont producteurs ou, au contraire, si c'est un produit de déchet de leur cycle vital.

2° G. Bohn (1901) [26] déclare que « *la fonction chromogène chez les bactéries n'est pas une fonction nécessaire* ».

En ce qui concerne les germes que nous avons étudiés, nous savons qu'à certains moments, difficilement explicables d'ailleurs, il est plus facile d'obtenir des cultures peu colorées que des cultures très colorées.

Nous savons aussi que cette fonction chromogène n'intervient pas dans le pouvoir pathogène, et dans l'étude de réactions humorales, Lasseur [80], Marchal [91], et Dupaix [45] (1930), ont même noté que les *caractères sérologiques* de la race blanche d'un germe étaient parallèles à ceux de la race chromogène.

3° Sur le rôle proprement dit des pigments, deux écoles se sont affrontées :

L'école d'Engelmann (1883-1888) [49] qui attribue aux bactéries pourpres un rôle de photosynthèse, c'est-à-dire de décomposition du CO_2 en présence de radiations lumineuses avec rejet d'oxygène, et l'école de Winogradsky [28 bis] qui leur attribue un rôle de chimiosynthèse.

D'après A. Dupaix [45], l'accord s'est fait avec les recherches de Buder (1919), de Bayendamm (1924), de l'école de Delft, et de van Niel [123] (1930), qui admettent l'hypothèse d'une photosynthèse suivie d'une chimiosynthèse.

Keilin (1925) [65-66] admet l'existence d'un *cytochrome*,

pigment respiratoire intracellulaire commun aux bactéries, aux levures, aux plantes supérieures et aux animaux.

Friedhem (1932) [51], étudiant le *B. violaceus*, conclut que le pigment rouge accélère la respiration.

O. Warburg [127], admet deux mécanismes de la respiration bactérienne : l'un se rattachant au système du pigment rouge au fer, c'est-à-dire du *cytochrome*, l'autre se rattachant au système du pigment jaune à base de *flavine*.

Ce dernier pigment est un ferment qui a été isolé par O. Warburg et W. Christian du suc de levure à fermentation basse ainsi que des bactéries lactiques vivant en anaérobiose.

R. Kuhn [73-74] en étudie la composition. C'est une matière protéique conjuguée, formée d'une protéine simple et d'un groupement prosthétique, pigment jaune : une *flavine*.

En janvier 1934, le même auteur en collaboration avec M. Boulanger isole cette *flavine* du lait, de l'œuf et du muscle, et au cours de la même année il l'identifie avec la *vitamine B²*.

Ces pigments bien définis sont les véritables enzymes de la respiration cellulaire. Ils sont les agents du mécanisme des transformations qui s'opèrent dans les milieux de culture, et comme l'orthoquinone, le glutathion, ils sont les *transporteurs d'hydrogène* nécessaires aux oxydations et réductions qui se succèdent dans la vie aérobie et anaérobie.

Ces observations sont d'un grand intérêt et il est vraisemblable que c'est dans cette voie que l'on trouvera la meilleure explication du rôle des pigments bactériens.

La chromogénèse chez les " *Prodigiosus* ".

On considère comme définitivement acquis que les « *Prodigiosus* », pour produire leur pigment, ont absolument besoin d'une vie aérobie, d'une température comprise entre 20° et 30°, d'une lumière plutôt diffuse, d'un milieu plutôt solide que liquide et plutôt acide que neutre.

Aérobiose et anaérobiose.

Liborius (1886) [87], Shotellius (1887) [117], considèrent *S. marcescens* comme anaérobie facultatif.

Scheurlen (1896) [114], Ritter (1900) [105], Samkow (1904) [112], Tempé (1931) [118] le présentent comme un germe essentiellement aérobie.

Combe [36] conclut que *S. marcescens*, *S. kiliensis*, *S. essayana* sont des aérobies stricts.

Nous avons classé *S. gutturis* et *S. stercoraria* comme des anaérobies facultatifs.

Mais, que l'on considère les « *Prodigiosus* » au point de vue de leur développement comme aérobies stricts ou anaérobies facultatifs, tous les auteurs anciens admettent une relation étroite entre la production du pigment et l'atmosphère ambiante.

Laurent (1890) [83], en étudiant *S. kiliensis* sur bouillon gélatiné, note que seules les colonies de surface sont pigmentées.

Delanoë [40], Péju et Rajat (1908) [101] font remarquer que dans les milieux liquides la prodigiosine est plus intense quand ceux-ci sont inclinés pour fournir une surface de contact plus grande avec l'oxygène de l'air.

Température.

Laurent (1906) [83] fixe la température limite de la chromogénèse pour *S. kiliensis* à $+36^{\circ}$.

Péju (1908) [101] note pour *S. marcescens* une végétation sans pigment à 27° - 28° .

Wasserzug (1888) [128] et Delanoë (1906) [40] ont aboli le pigment chez *S. marcescens* par des passages répétés à $+37^{\circ}$.

Certains artifices de culture sont de bons adjuvants de la pigmentation : quelques heures à la température optimum, suivies d'un séjour à une température plus basse, conviennent très bien pour régénérer ou exalter une fonction chromogène déficiente.

Lumière.

Cordier, Péju et Rajat (1908) [37] ont étudié l'influence des diverses radiations de la lumière blanche sur la fonction chromogène du *B. prodigiosus*.

Béguet (1928) [12] a cultivé ce microbe sur gélose inclinée. Les caractéristiques de son milieu sont les suivantes : pH=7,6; tension superficielle=4,5; concentration NaCl=9 ‰; température= 11° - 16° .

Les tubes ont été disposés sur le rebord d'une fenêtre exposée au nord, sans soleil. Les uns ont été recouverts de papier noir, les autres restant nus. Il a obtenu une teinte à peine rosée pour les tubes nus et une couleur rouge carmin vif pour les tubes sous papier. Une autre série, placée à l'intérieur du laboratoire à deux mètres de la fenêtre, a montré des différences à peine appréciables entre les tubes nus et les tubes sous papier.

Laurent [83] considère *S. kiliensis* comme sensible à l'action de la lumière, la partie la plus réfrangible du spectre solaire étant celle qui donne le mieux une race achromogène.

Dans un travail récent Khouri [68] étudie l'action de divers écrans colorés sur différentes bactéries chromogènes.

Milieux solides.

L'historique de *S. marcescens* montre que ce germe a pu se développer avec son pigment sur des milieux très divers : polenta (farine de maïs bouillie), viande crue ou bouillie, farine de blé, bouillie d'amidon, soupe au riz, quartiers de poire.

Parmi les premiers auteurs qui se sont intéressés à *S. marcescens* et *S. kiliensis*, Montagne (1852) [97], Schrötter (1875) [115], Wasserzug (1888) [128], Breunig (1888) [30], Laurent (1890) [83], Jaroslow et Peklo (1910) [60], Béguet (1928) [12] signalent une production plus facile et plus régulière du pigment sur les milieux solides que sur les milieux liquides.

Les Allemands, entre autres Rosenberg [110], ont surtout préconisé les pommes de terre. « Elles doivent, disent-ils, être grandes et lisses. On les lave minutieusement. On les épluche. On les coupe en lamelles de 1 cm. d'épaisseur. On les stérilise deux fois. Après refroidissement, on les recouvre de la culture qu'on laisse dans une pièce à 15°-20°, mais plutôt proche de 20°. Après 16 heures, on aperçoit un début de coloration rouge alors que sur gélose ou sur gélatine il faut parfois at-

tendre 8 à 10 jours et les pigments obtenus, d'ailleurs plus pâles, n'atteignent jamais le même développement. »

Aux pommes de terre simples, Lasseur [82] préfère les pommes de terre glycélinées.

En plus des milieux solides courants, Combe [36] a obtenu la pigmentation de ses trois germes sur les tubercules de dahlia et sur l'artichaut. Sur celui-ci le pigment passerait au vert le quatrième jour. La carotte paraît tout à fait défavorable.

Sur gélatine en plaques, le même auteur note pour *S. marcescens* et *S. kiliensis* l'apparition de la prodigiosine à la périphérie des colonies, alors que pour *S. essayana* elle commencerait par le centre

Milieux liquides.

Les milieux liquides courants, bouillon de viande, eau peptonée, lait, n'ont jamais permis une production intense du pigment.

Nous verrons plus loin comment l'adoption de nouvelles formules, dans les études microbiologiques, a placé les milieux liquides en rivaux des milieux solides dans la chromogénèse.

Réaction du milieu.

Hefferan (1904) [56-57], Péju et Raja (1907) [101], signalaient déjà l'action favorable des milieux acides sur l'apparition du pigment.

Béguet (1928) [12] est arrivé aux mêmes conclusions. Seul, toutefois, opérant sur gélose, il a pu obtenir un *B. prodigiosus* d'un rose faible à un pH=11.

Les notions de pH, appliquées à l'étude des pigments, ont évidemment apporté des précisions à ce sujet. Nous le verrons dans les pages qui suivent.

Autres facteurs.

A côté de ces grands facteurs d'ordre général quelques autres points particuliers ont été entrevus.

Cordier, Péju et Rajat [38] notent l'action de liquides à haute tension de vapeur sur *B. prodigiosus*, ce qui leur permet d'obtenir des races achromogènes.

Béguet (1908) [12] fait remarquer que, dans les cultures sur gélose, la couleur s'intensifie à mesure que la tension superficielle s'abaisse. De plus, dans son étude des variations de production du pigment, ayant envisagé l'influence du pH, de NaCl, de la tension superficielle, de la température, de l'oxygénation, de l'éclairement, il conclut très raisonnablement en disant que « *tous ces résultats se trouvent influencés dans une certaine mesure par le chevauchement des conditions pendant le temps de culture.* »

Et, d'autre part, ayant considéré que les souches entraînées aux milieux hypertoniques produisent sur milieu normal un pigment rouge très intense à 16°, alors que les souches entraînées aux milieux hypotoniques donnent des colonies d'un blanc porcelaine, il termine son étude en disant que « *dans l'établissement des conditions optima d'apparition du pigment, il convient d'ajouter aux facteurs dépendant du milieu de culture le facteur physico-chimique du microbe. Ces diverses conditions se combinent entre elles, s'additionnent ou s'annihilent suivant la valeur ou la proportion de chacun des éléments du complet.* »

Orientation des travaux modernes.

Les milieux synthétiques chez les “ *Prodigiosus* ” et autres germes chromogènes.

Puisque le mécanisme de la chromogénèse apparaît si complexe, on a donc conçu qu'il serait intéressant, sinon nécessaire, de préciser la base de tout travail à ce sujet.

Si le milieu était avant tout fixe, bien défini, variable au gré de l'expérimentateur et en des proportions mesurables, le travail pouvait gagner en précision.

En France, c'est à Lasseur et à ses élèves [76 à 82] que l'on doit le plus grand nombre de travaux relatifs à la chromogénèse des bactéries sur milieux chimiques.

Leur méthode de travail est la méthode synthétique, c'est-à-dire qu'ils cultivent les bactéries sur un milieu de composition connue, puis ils suppriment tour à tour les constituants du milieu. Les autres conditions restant égales, ils aperçoivent ainsi l'influence de la suppression d'un des éléments, soit sur le rendement en corps microbiens, soit sur le rendement en corps colorés.

On arrive ainsi à traduire, en quelque sorte, dans un langage mathématique et par conséquent précis, la biologie des bactéries.

A la suite de Raulin [103] et de ses continuateurs, J. Duclaux [44], G. Bertrand [18], Javillier [61], Agulhon [2], la curiosité des expérimentateurs a été surtout attirée par le rôle des « *infinitement petits chimiques* ».

Le Fer.

Bortels (1927) [28] et Combe (1930) [36] ont démontré l'influence du *Fer* dans l'apparition de la *prodigiosine*. Combe a même donné une explication de son mécanisme d'action.

Mais Khouri [68] ne semble pas d'accord avec Combe [36], ni même avec les travaux de l'école de Lasseur sur la chromogénèse en général. Il a constaté notamment que le développement de *Bacillus violaceus* était arrêté par le *sulfate ferreux* à la dose de 0 gr. 002 par 8 cm³ de milieu au jaune d'œuf qui est pourtant extrêmement favorable dans les conditions habituelles.

Et pourtant le *Fer* n'a-t-il pas permis à Lasseur et Thiry (1911) [78] d'obtenir de belles colorations dans les cultures de bactéries du groupe *subtilis* (*B. mesentericus*, *B. megatherium*), considérées jusqu'alors comme achromogènes? Le fait peut être considéré comme isolé, il n'en est pas moins intéressant.

Le Manganèse et le Cuivre.

Kharasch, Conway et Bloom (1937) [63] déclarent que Mn^{++} (sels manganeux), Cu^{++} (sels cuivreux), Fe^{+++} (sels ferriques) ont une action défavorable sur la pigmentation et le développement de diverses bactéries.

Cu^{++} supprimerait la formation du pigment de *S. pyogenes aureus* et de *B. pyocyaneus* à une dose de 1/50 000.

Le Nickel.

Manoilow (1907) [90] considère le rôle du *Nickel* comme nul dans la pigmentation chez les microorganismes.

Le Zinc.

Cataliotti (1935) [34] examine celui du *Zinc* chez *B. pyocyaneus*. Au taux de 1/100 à 1/500 la végétation est normale. Si l'on atteint 1/50, croissance et pigmentation se trouvent dans des conditions défavorables.

L'Uranium.

D'après Agulhon [3] et Sazerac [3] les sels d'*Uranium* au 1/1000 et l'*Uranium* favoriseraient la pigmentation de *B. pyocyaneus*.

Le Plomb.

D'après Khouri [68], le *Plomb* serait défavorable à ce même bacille.

Le Magnésium.

Le rôle du *Magnésium* est démontré par Samkow (1903) [112] et par Kuntze (1907) [75], comme indispensable à la pigmentation du *B. prodigiosus*, alors que Hefferan (1904) [56] le conteste plus ou moins.

Nous n'avons pas connaissance d'un travail précis sur l'influence réelle du magnésium sur la production de la *prodigiosine*. Dans la thèse de Khouri [68], nous avons même relevé deux formules de milieux minéraux favorables au *B. prodigiosus* et à son pigment et qui ne contiennent pas de magnésium.

Pourtant chez d'autres germes chromogènes sa présence semble indispensable. Lasseur [76] l'a démontré d'une façon nette en travaillant sur la *chlororaphine* du

B. chlororaphis. Bien mieux, A. Dupaix [45], en étudiant le *B. caryocyanus*, a établi une gamme des quantités de SO_4Mg nécessaires à la fluorescence du germe.

Après les aliments minéraux, voyons le rôle des *aliments hydrocarbonés*.

Bien que leur rôle exact soit difficile à mettre en lumière, on semble d'accord pour attribuer une grande importance à la *glycérine*.

La Glycerine.

Avec ce corps, Lasseur [82] a réalisé une expérience dont l'interprétation paraît très complexe.

B. prodigiosus, cultivé sur *pomme de terre glycinée*, le tubercule reposant sur un tampon de coton hydrophile, offre deux aspects différents, suivant que le coton est à peine imprégné d'eau glycinée, ou au contraire complètement recouvert :

1° Si la quantité d'eau glycinée est suffisante pour recouvrir le tampon de coton, après 6 jours de culture, le tubercule est recouvert d'un enduit rouge vermillon. Le coton est rigoureusement blanc.

2° Si la quantité d'eau glycinée est extrêmement faible, de telle sorte qu'elle ne fasse qu'imprégner légèrement le tampon de coton, au 6^e jour de culture, le tubercule est blanc ou à peine rosé. Par contre, le coton est coloré en rouge vermillon.

En somme, à mesure que croît la quantité d'eau glycinée, la coloration du coton diminue, tandis que celle du tubercule augmente. Si la quantité d'eau glycinée continue à croître, la partie du tubercule

immergée ne se colore plus et n'est même plus envahie par l'enduit bactérien.

Lorsqu'on remplace l'eau glycinée par l'eau distillée, il n'existe plus de relation étroite entre la quantité d'eau et la coloration des cultures.

On voit donc que *B. prodigiosus* réagit différemment à l'eau glycinée et à l'eau distillée. Comment expliquer cette influence ? Les milieux hypertoniques favorisent la chromogénèse ; or, l'eau distillée est hypotonique et l'eau glycinée à 5 % est hypertonique. De même, l'oxydabilité du milieu glyciné est certainement très différente de celle du milieu non glyciné.

Cette expérience est valable également pour *S. kiliensis*. Par contre, chez *B. chlororaphis*, *B. mesentericus*, *B. caryocaneus*, les résultats ont été plus douteux.

Chez *B. chlororaphis*, ils sont très irréguliers.

Chez certaines souches de *B. mesentericus niger*, la glycérine s'oppose à la production du pigment ardoisé ou noir.

Chez *B. caryocaneus*, la quantité d'eau glycinée influence moins la coloration du tubercule que celle du coton.

Ce rôle primordial attribué à la glycérine n'a d'ailleurs pas toujours été comparé au rôle que pouvaient avoir d'autres aliments carbonés.

A. Dupaix [45], admet que pour *B. caryocaneus*, en milieux synthétiques, la glycérine est indispensable, sans établir de parallèle avec les autres sources d'aliments carbonés.

Les Glucides.

Marchal [91] étudiant deux variétés de *Prodigiosus* : une race rouge et une race blanche, précise seulement l'influence de la glycérine et de la mannite.

Le lévulose aurait un pouvoir favorisant un peu plus faible. Les autres glucides ne sont pas envisagés.

Delanoë [40] avait déjà tiré ces conclusions en 1903. Il ajoutait même que le lactose, le saccharose, le glucose empêchaient la pigmentation.

Hershey et Bronnfenbrenner (1936) [59] constatent que le développement du pigment dans les cultures de *Serratia marcescens* n'exige pas spécifiquement du glucose, mais dépend de la présence de matières contenant les groupes aldéhydiques ou cétoniques disponibles.

Pour ces mêmes auteurs, la formation du pigment dans *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosae*, *Serratia marcescens*, *Torula rosea*, *Sarcina lutea*, *Spirillum rubrum* et *Aspergillus niger*, se développant dans des milieux différents, pourrait être arrêtée par la *diphénylamine*, parfois à la première transplantation et d'autres fois après plusieurs sous-cultures.

Si le fer a permis à Lasseur et Thiry [78] de faire naître un pigment chez les Bacilles du groupe *subtilis* (*B. mesentericus*, *B. megatherium*), M^{re} Cado (1936) [32] a signalé l'apparition d'un pigment jaune d'or chez une souche de *Pneumocoque* cultivée en milieu synthétique au *glucose*.

Le glucose, comme source de carbone, aurait-il contribué à cette apparition ?

Le pH.

Enfin, toutes ces études sur la chromogénèse ont été complétées par l'étude des *Réactions* en milieu synthétique, avant la culture et au bout d'un temps plus ou moins long de développement.

D'une façon générale, chez toutes les bactéries pigmentaires, la mesure du pH a mis au tout premier plan l'influence des ions H sur la végétation et sur la chromogénèse.

Nous dirons cependant que ces notions sont encore assez vagues, puisque la concentration en ions H et OH se modifie au fur et à mesure de la croissance des bactéries et *n'est pas répartie également dans tout le tube de culture.*

CHAPITRE II

Grâce aux milieux synthétiques, des acquisitions intéressantes ont donc été faites dans le domaine de la chromogénèse.

Inconstance et complexité, tels sont les caractères qui se dégagent de l'observation des cultures sur milieux solides courants.

Ces caractères subsistent encore avec les nouveaux milieux, mais cependant avec une intensité moindre.

Le rôle du *Fer*, démontré par Lasseur et ses élèves [76 à 82], est certainement très spécial, mais d'après l'explication qu'ils en donnent (Combe [36] écrit qu'il faut le considérer comme un vecteur d'oxygène), nous nous sommes demandé si vraiment il avait seul le privilège de favoriser la pigmentation, d'autres ions étant aussi de bons vecteurs d'oxygène.

Ce que nous connaissons du rôle de quelques glucides dans la chromogénèse demanderait peut-être à être étendu à d'autres de ces corps et même à quelques autres aliments carbonés.

Ainsi notre étude sur la chromogénèse comportera deux parties :

§ I. — Influence sur la chromogénèse des métaux catalyseurs.

§ II. — Influence sur la chromogénèse de la nature de l'aliment carboné.

§ I. — Influence des métaux catalyseurs.

Dans l'étude de la chromogénèse, Lasseur et ses élèves [76 à 82] ont mis au point un milieu dont la préparation nécessite quelques précautions.

La simple lecture de la formule pose plusieurs questions et la consultation des différents ouvrages décrivant les petites expériences ou les longs travaux effectués avec ce milieu ne donne pas tous les éclaircissements suffisants.

Formule du milieu Lasseur dit : milieu L₁ avec Fer.

Asparagine	0 gr. 90
Glycérine	2 gr. 50
Phosphate bipotassique.....	0 gr. 25
Sulfate de magnésie.....	0 gr. 50
Chlorure de calcium.....	0 gr. 04
Sulfate ferreux.....	0 gr. 01
Eau bidistillée.....	Q. S. p. 100 cc.

Préparation :

Les différents constituants seront pesés et employés dans l'ordre indiqué par la formule. On remarque tout de suite qu'il faut s'attendre à avoir des précipitations, puisque le milieu renferme du phosphate, de la magnésie, du calcium et du fer. Mais on les retarde et les réduit en adoptant le mode opératoire suivant :

- 1° Dissoudre l'asparagine à chaud (ébullition).
- 2° Ajouter glycérine et phosphate.

3° Refroidir vers 37°.

4° Ajouter successivement SO_4Mg , CaCl_2 et SO_4Fe .

5° Amener à un pH convenable ⁽¹⁾.

6° Compléter au volume.

En ce qui concerne le fer, on veillera à adopter la technique suivante ⁽²⁾ :

Dans de l'eau bidistillée (100 cc.) privée d'air par ébullition prolongée, et refroidie à 25°-30° à l'abri de l'air, on fait dissoudre un gramme de SO_4Fe (cristaux non altérés) afin de réduire au minimum les phénomènes d'hydrolyse.

On n'agit pas durant la dissolution qui peut être assez longue. Lorsque cette dernière est terminée, on homogénise, par mélange, la solution, mais toujours à l'abri de l'air.

Ces solutions sont limpides, néanmoins elles doivent être utilisées aussitôt leur préparation et on doit refaire une solution de sulfate ferreux pour chaque fabrication de milieu synthétique.

Ce milieu étant préparé, on le répartit en tubes. Nous faisons remarquer que cette répartition est également délicate. En effet, quelles que soient les précautions qu'on ait prises, on n'arrive pas toujours à avoir un milieu absolument limpide. Au pH de nos cultures, il est légèrement opalescent. Nous ne l'avons jamais filtré, mais nous avons eu soin d'agiter fortement

(1) Nous avons toujours utilisé un pH compris entre 5,8 et 5,9 (échelle colorimétrique). Les constituants donnant un milieu voisin de la neutralité, il nous fallait donc ajouter un peu d'acide. Comme notre installation ne nous permettait pas de préparer plus de 600 cc. de milieu à la fois, nous versions avant de compléter au volume 4 cc. 2 de SO_4H_2 $\frac{N}{1}$ pour 600 cc. de volume total.

(2) Il faudra prendre les mêmes précautions avec les autres ions métalliques à essayer.

le milieu avant d'aspirer à la pipette les 10 cc. nécessaires pour chaque tube.

D'ailleurs, la filtration serait inutile, car au cours de la stérilisation des tubes (20 minutes à 115°) une nouvelle précipitation se produit.

Résultats obtenus chez les " Prodigiosus "
avec le milieu Lasseur dans les travaux antérieurs.

Combe [36] a démontré que si on fait subir à *Serratia marcescens* plusieurs passages sur une suite de milieux sans fer, on n'obtient plus de chromogénèse.

De plus, si à une culture achromogène, obtenue par cet artifice, on ajoute au bout d'un temps convenable, une quantité optimum de fer, la pigmentation apparaît.

Ces résultats paraissent très intéressants. Néanmoins, nous avons repris ce travail et nous avons suivi une marche analogue en substituant au fer différents ions.

Résultats des expériences.

Au moment de nos expériences (température 20°-22°), nous avons à notre disposition différentes souches de germes qui, sur gélose, se présentaient ainsi :

<i>Serratia marcescens</i> .	{	Pigmentation rouge vermillon.
<i>S. kiliensis</i> .		
<i>S. essayana</i>	{	Un type à pigment rouge.
		Un type achromogène.
<i>S. gutturis</i>	{	Un type à pigment rouge.
		Un type achromogène.
<i>S. stercoraria</i>	{	Un type à pigment rose-rouge.
		Un type achromogène.

Les ions essayés parallèlement au fer ont été : *Cu*, *Zn*, *Cd*, *Mn*, *Ni*, *Co*, *Cr*. Tous ont été employés sous forme de sulfates, et à la concentration du fer, soit 1/10 000.

Quel que soit l'ion envisagé, la culture s'est très bien développée pour les cinq germes essayés. La quantité employée n'était donc nullement antigénétique.

Pour ne pas nous en tenir à une seule observation, nous avons procédé à des repiquages successifs tous les deux ou trois jours, jusqu'au 12^e passage. Nous obtenions ainsi des germes entraînés à tel ou tel ion.

Au cours de l'évolution de la culture, nous avons pu apprécier l'influence d'un même poids de ces éléments à la fois sur le rendement en corps microbiens et en corps colorés.

La pigmentation a été appréciée dans sa genèse, son allure et son intensité en la comparant à celle obtenue sur des « *milieux au fer* » et celle obtenue sur des « *milieux sans fer* ».

Nous considérerons, d'une part, les *Races chromogènes* et, d'autre part, les *Races achromogènes*.

Races chromogènes.

Nous résumons les résultats sous forme de tableaux dans lesquels nous notons en valeurs arbitraires la pigmentation aux différents passages et à deux âges différents de la culture.

Par ce procédé, nous avons pu déterminer la fréquence des meilleures valeurs chez les divers électrolytes et leurs variations possibles.

A la fin des 12 expériences, nous avons totalisé les notes attribuées, la plus haute correspondant à l'électrolyte de meilleure qualité.

La note 10 correspond à un voile épais, d'un beau rouge, ou d'un rose intense.

De 10 à 5, on passe insensiblement à un voile moins épais, de teintes dégradées.

De 5 à 1, on n'a qu'un liseré coloré plus ou moins net.

TABLEAU I

S. marcescens.

Intensité de la pigmentation exprimée en valeurs arbitraires de 0 à 10.

	Après 48 heures de culture.									Après 7 jours de culture.								
	Fe	Cu	Zn	Cd	Mn	Ni	Co	Cr.	S. Fe	Fe	Cu	Zn	Cd	Mn	Ni	Co	Cr.	S. Fe
1 ^{er} passage.	10	4	8	0	7	6	3	5	9	10	5	9	0	7	8	4	6	9
2 ^e —	8	5	7	0	4	6	2	9	9	10	6	8	0	5	7	4	9	8
3 ^e —	9	3	8	0	10	6	3	7	5	10	5	7	0	6	4	8	9	5
4 ^e —	10	7	9	0	8	6	3	5	4	10	7	9	0	8	6	4	5	3
5 ^e —	10	5	6	0	7	8	3	9	2	10	4	6	0	7	5	8	9	3
6 ^e —	10	5	6	0	9	4	8	7	5	10	8	9	0	4	6	7	5	2
7 ^e —	10	5	4	0	9	8	6	7	6	10	4	9	0	6	8	7	5	2
8 ^e —	10	4	7	0	6	5	8	9	5	10	6	8	0	7	4	9	5	2
9 ^e —	10	5	7	0	3	6	9	8	5	10	5	7	0	4	6	9	8	2
10 ^e —	10	6	9	0	5	7	9	8	7	10	5	9	0	6	4	8	7	3
11 ^e —	10	4	9	0	7	6	8	5	4	10	4	8	0	5	6	7	9	2
12 ^e —	10	3	6	0	8	4	9	7	4	10	4	8	0	5	9	6	7	2
	117	56	86	0	83	72	71	86	65	120	63	97	0	70	73	81	84	43

TABLEAU II
S. kiliensis.

Intensité de la pigmentation exprimée en valeurs arbitraires de 0 à 10.

	Après 48 heures de culture.									Après 7 jours de culture.									
	Fe	Cu	Zn	Cd	Mn	Ni	Co	Cr.	S.	Fe	Cu	Zn	Cd	Mn	Ni	Co	Cr.	S.	Fe
1 ^{er} passage.	10	5	9	0	8	7	4	6	9	10	7	6	0	9	5	4	8	9	
2 ^e —	10	6	5	0	7	9	4	8	9	10	4	5	0	6	8	7	9	6	
3 ^e —	10	5	9	0	8	4	6	7	4	10	6	9	0	4	5	7	8	5	
4 ^e —	10	6	7	0	8	9	4	5	5	10	5	9	0	6	8	4	7	5	
5 ^e —	10	5	8	0	6	9	4	5	8	10	4	9	0	5	8	7	6	9	
6 ^e —	10	7	8	0	5	3	9	6	4	10	9	4	0	5	6	8	7	3	
7 ^e —	10	8	9	0	4	7	6	5	5	10	8	9	0	4	7	6	5	4	
8 ^e —	10	8	9	0	5	4	7	6	4	10	9	4	0	6	5	8	7	4	
9 ^e —	10	8	7	0	7	9	5	6	2	10	8	7	0	9	4	5	6	3	
10 ^e —	10	4	7	0	8	6	9	5	5	10	6	9	0	7	6	9	8	3	
11 ^e —	10	9	8	0	7	3	6	4	6	10	8	9	0	5	4	7	6	2	
12 ^e —	10	9	7	0	8	6	3	4	5	10	8	7	0	9	5	4	6	3	
	120	80	93	0	81	76	67	67	66	120	82	87	0	71	71	76	83	56	

TABLEAU III
S. essayana.

Intensité de la pigmentation exprimée en valeurs arbitraires de 0 à 10.

	Après 48 heures de culture.									Après 7 jours de culture.										
	Fe	Cu	Zn	Cd	Mn	Ni	Co	Cr.	S.	Fe	Fe	Cu	Zn	Cd	Mn	Ni	Co	Cr.	S.	Fe
1 ^{er} passage.	9	5	9	0	8	7	4	6	9	9	5	9	0	8	7	3	6	7		
2 ^e —	8	0	8	0	0	0	9	0	4	8	6	7	0	8	3	9	5	3		
3 ^e —	8	0	0	0	0	0	8	0	2	10	3	7	0	0	8	9	6	2		
4 ^e —	9	0	9	0	0	0	0	6	0	9	3	9	0	0	0	8	7	0		
5 ^e —	9	0	8	0	7	9	6	0	0	10	5	8	0	4	7	9	6	3		
6 ^e —	8	9	4	0	8	6	5	7	7	8	9	8	0	5	6	4	7	0		
7 ^e —	8	0	9	0	7	6	5	8	0	8	3	9	0	5	4	8	7	5		
8 ^e —	8	0	9	0	8	0	7	0	4	8	3	9	0	8	3	7	3	5		
9 ^e —	7	0	9	0	4	0	0	0	4	8	4	9	0	3	4	8	7	0		
10 ^e —	7	0	8	0	9	0	0	0	0	8	7	9	0	8	0	7	6	0		
11 ^e —	9	0	8	0	9	0	7	0	0	9	8	7	0	9	0	6	4	0		
12 ^e —	9	7	8	0	9	0	0	0	0	10	8	7	0	9	0	5	6	0		
	99	21	89	0	69	28	51	27	30	105	64	98	0	67	42	83	70	25		

TABLEAU IV

S. stercoraria.

Intensité de la pigmentation exprimée en valeurs arbitraires de 0 à 10.

	Après 48 heures de culture.										Après 7 jours de culture.									
	Fe	Cu	Zn	Cd	Mn	Ni	Co	Cr.	S.	Fe	Fe	Cu	Zn	Cd	Mn	Ni	Co	Cr.	S.	Fe
1 ^{er} passage.	10	7	6	0	3	5	4	9	3	10	5	5	0	6	4	0	7	3		
2 ^e —	10	3	8	0	9	0	0	3	7	10	0	5	0	6	0	0	0	7		
3 ^e —	10	0	3	0	9	0	8	4	2	10	5	6	0	9	0	8	0	2		
4 ^e —	10	9	3	0	0	0	4	0	2	10	9	5	0	4	0	3	2	2		
5 ^e —	10	8	7	0	9	5	4	3	4	10	8	7	0	9	5	4	3	2		
6 ^e —	10	0	8	0	9	0	7	0	0	10	0	8	0	9	0	7	0	0		
7 ^e —	10	0	7	0	9	0	8	0	0	10	0	8	0	9	0	8	0	0		
8 ^e —	10	5	9	0	7	5	8	6	0	10	0	8	0	6	0	9	7	0		
9 ^e —	10	0	7	0	9	0	8	0	0	10	0	7	0	9	0	8	6	0		
10 ^e —	10	0	0	0	9	6	8	7	2	10	0	0	0	9	6	8	7	3		
11 ^e —	10	0	0	0	9	6	8	7	0	10	0	0	0	9	6	8	7	0		
12 ^e —	10	9	8	0	0	0	7	0	0	10	9	8	0	0	0	7	0	0		
	120	41	66	0	76	27	74	39	20	120	33	67	0	85	21	70	39	19		

TABLEAU V.

Serratia gutturalis.

Serratia gutturalis a présenté cette particularité au cours de toutes nos expériences de ne jamais pigmenter sur les milieux liquides, même sur le milieu Lasseur I au fer, ou du moins d'une façon très insignifiante, alors que la même souche produisait un pigment intense sur gélose et sur sérum de bœuf coagulé.

Nous avons répété l'expérience réalisée par Combe [36], qui a trouvé qu'un apport de *fer* au 5^e jour de la culture provoque une apparition immédiate du pigment, simplement en laissant tomber goutte à goutte à la surface du liquide de culture 1 cm³ d'une solution de SO⁴Fe à 1 %.

Nous n'avons pas obtenu d'aussi bons résultats :

Lorsqu'on ajoute prudemment la solution de SO⁴Fe à la partie supérieure des tubes de culture de *S. marcescens*, *S. kiliensis*, *S. essayana*, *S. stercoraria*, il se produit une teinte violacée, plus ou moins intense, mais nous estimons que :

a) Cette teinte rose-violacée immédiate n'approche que de très loin la teinte normale de la prodigiosine.

b) Elle se présente comme le fait d'une réaction qui n'est pas toujours fidèle, ni parfaite.

c) Elle ne progresse guère par la suite : elle a plutôt tendance, avec le temps, à jaunir et à disparaître. Il est très rare que l'apport de *fer* contribue à faire apparaître la véritable chromogénèse dans les jours qui suivent, ou à intensifier celle qui existe déjà faiblement.

L'époque la plus favorable pour l'apport tardif de *fer* nous a semblé être entre le 5^e et le 10^e jour de culture.

S. marcescens et *S. kiliensis* accusent la réaction le 5^e jour et parfois dès le 4^e jour.

S. essayana et *S. stercoraria* ont mieux réagi en opérant entre le 7^e et le 10^e jour.

S. gutturis s'est montré absolument insensible.

4° *Cultures sur milieux sans Fer, et apport tardif d'un ion autre que le Fer.*

Nous avons encore repris l'expérience de Combe.

Quels que soient le germe et le cation considérés, *tous nos résultats ont été négatifs.*

RÉSUMÉ.

1° Les propriétés attribuées au *Fer* dans la chromogénèse restent confirmées. Les plus belles pigmentations appartiennent aux milieux le contenant, à condition toutefois de partir de souches *très chromogènes* (Ex. : *S. marcescens*, *S. kiliensis*).

2° Un milieu Lasseur L₁, exempt de fer, permet aussi la pigmentation, à condition également de partir de souches *très chromogènes* (Ex. : *S. marcescens*, *S. kiliensis*).

Toutefois, à partir du 7° passage, nous avons noté un affaiblissement, mais jamais une disparition complète.

3° La comparaison avec les milieux sans fer conduit à considérer certains autres ions comme n'étant pas indifférents au phénomène de la pigmentation, bien qu'ils ne soient pas tous précisément des *vecteurs d'oxygène*. (Ex. : Le zinc.)

Un bon vecteur d'oxygène comme le manganèse exerce une action inférieure à celle du zinc.

On remarquera l'action absolument empêchante du cadmium.

4° Si l'on part de souches *nettement achromogènes*, le milieu au fer ne restitue pas aux cultures-filles leur pouvoir chromogène. (Ex. : *S. essayana*, *S. gutturis*, *S. stercoraria*.)

5° Nous considérons l'addition tardive de fer aux cultures achromogènes ou faiblement chromogènes comme déterminant une réaction au sein du milieu de culture et non comme provoquant une vraie pigmentation.

La coloration obtenue par cet artifice est inférieure en intensité et en durée à la coloration obtenue au cours du développement microbien et ne lui est même pas comparable. Il s'agit, sans doute, d'une oxydation des sels ferreux en sels ferriques.

6° Les ions (Zn-Cu-Cr-Co-Mn), que nous considérons comme de bons stimulants de la chromogénèse, ajoutés postérieurement, n'ont pas cette propriété particulière de l'ion fer.

7° Si l'on examine les différents tableaux, on constate que l'action de tous ces ions (plus ou moins actifs) s'exerce surtout en fonction du temps.

En général, les « notes » sont meilleures au bout de 7 jours qu'après 48 heures.

Le phénomène inverse se produit avec les milieux *sans fer*. La pigmentation qui semble bien amorcée dans les premières heures de la culture a tendance à se réduire avec le temps.

8° Le rôle qu'exercent les différents ions dans la chromogénèse n'est pas facilement explicable.

Les considérer comme de simples vecteurs d'oxygène nous paraît trop simple. Nous pensons plutôt qu'ils stimulent le métabolisme des germes dans un certain sens et que des causes secondaires interviennent que nous tenterons d'expliquer dans nos conclusions définitives.

§ II. — Influence de différentes sources d'aliments carbonés.

Nous rappelons que les souches chromogènes de nos différents germes pigmentent habituellement sur milieu Lasseur L₁, de la manière suivante :

S. marcescens et *S. kiliensis* = voile rouge intense, très épais, très plissé.

S. essayana = moyen chromogène (léger voile rose, ou liquide rosé).

S. gutturis = très faiblement chromogène ou *achromogène*.

S. stercoraria = voile crémeux rose-rouge, liquide souvent rosé.

Dans le milieu Lasseur L₁, l'aliment carboné est fourni à la fois par la glycérine et par l'asparagine.

La glycérine est toutefois la principale source, et de plus il faut se rappeler qu'elle est considérée comme exerçant une action particulière dans la production du pigment.

Nous avons étudié les variations possibles dans l'intensité de la pigmentation en substituant à la glycérine différents glucides et quelques autres corps susceptibles de jouer le rôle de source de carbone.

Nous avons essayé : l'amidon.

2 Pentoses : xylose, arabinose.

3 Bioses : glucose, lévulose, galactose.

3 Hexobioses : saccharose, lactose, maltose.

- 2 Alcools : alcool éthylique, mannite.
2 Sels d'acides organiques : acétate de sodium,
citrate de sodium.

Dans une autre expérience, nous avons modifié la formule de Lasseur de la manière suivante :

Sulfate d'ammoniaque.....	0 gr. 20
Glucose ou autre corps carboné.	2 gr. 50
Phosphate bipotassique.....	0 gr. 25
Sulfate de magnésie.....	0 gr. 50
Chlorure de calcium.....	0 gr. 04
Sulfate ferreux	0 gr. 01
Eau bidistillée.....	Q. s. p. 100 cc.

De cette façon, l'aliment carboné est fourni par un seul corps.

S. marcescens.

RÉSULTATS DES EXPÉRIENCES N° 1 ⁽¹⁾.

Source d'Azote = Asparagine.

Source de Carbone = Asparagine + un des corps ci-dessous.

<i>Apparition du pigment</i>	Après 48 heures.	Après 3 jours.	Après 4 jours.	Après 6 jours.	Après 8 jours.	Après 10 jours.
Amidon..... (2,5 %)	+	+	+	+	+	+
Arabinose..... —	O	+	+	+	+	+
Xylose..... —	O	+	+	+	+	+
Glucose..... —	+	+	+	+	+	+
Lévéulose..... —	+	+	+	+	+	+
Galactose..... —	O	+	+	+	+	+
Saccharose..... —	+	+	+	+	+	+
Lactose..... —	+	+	+	+	+	+
Maltose..... —	+	+	+	+	+	+
Alcool à 95°... (0 cc. 2 %)	O	O	O	O	?	?
Mannite..... (2,5 %)	+	+	+	+	+	+
Acétate de sodium.. —	O	O	O	O	O	O
Citrate de sodium.. —	O	+	+	+	+	+

(1) Dans ce tableau et dans tous ceux qui suivent, la présence de pigment net est indiquée par +. — O indique une culture achromogène. — ?, indique un pigment *très faible* ou *douteux*.

RÉSULTATS DES EXPÉRIENCES N° 2.

Source d'Azote = Sulfate d'Ammoniaque.

Source de Carbone = un des corps ci-dessous.

<i>Apparition du pigment</i>	Après 48 heures.	Après 3 jours.	Après 4 jours.	Après 6 jours.	Après 8 jours.	Après 10 jours.
Amidon (2,5 %)	0	0	?	?	?	+
Arabinose —	0	0	0	0	0	0
Glucose —	0	0	0	0	0	0
Saccharose —	0	0	0	0	0	0
Lactose —	0	0	?	?	?	+
Alcool à 95°. (0 cc. 2 %)	0	0	0	0	?	?
Mannite (2,5 %)	+	+	+	+	+	+
Acétate de sodium.. —	0	0	0	0	0	0
Citrate de sodium.. —	0	?	+	+	+	+

S. kiliensis.

RÉSULTATS DES EXPÉRIENCES N° 1.

Source d'Azote = Asparagine.

Source de Carbone = Asparagine + un des corps ci-dessous.

<i>Apparition du pigment</i>	Après 48 heures.	Après 3 jours.	Après 4 jours.	Après 6 jours.	Après 8 jours.	Après 10 jours.
Amidon (2,5 %)	0	+	+	+	+	+
Arabinose —	0	0	0	0	0	0
Xylose —	0	+	+	+	+	+
Glucose —	0	+	+	+	+	+
Lévilose —	0	+	+	+	+	+
Galactose —	0	0	0	0	0	0
Saccharose —	0	+	+	+	+	+
Lactose —	0	+	+	+	+	+
Maltose —	0	+	+	+	+	+
Alcool à 95°. (0 cc. 2 %)	0	0	0	0	?	?
Mannite (2,5 %)	0	+	+	+	+	+
Acétate de sodium.. —	0	0	0	0	0	0
Citrate de sodium.. —	0	+	+	+	+	+

RÉSULTATS DES EXPÉRIENCES N° 2.

Source d'Azote = Sulfate d'ammoniaque.

Source de Carbone = un des corps ci-dessous.

<i>Apparition du pigment</i>	Après 48 heures.	Après 3 jours.	Après 4 jours.	Après 6 jours.	Après 8 jours.	Après 10 jours
Amidon..... (2,5 %)	0	0	0	0	?	+
Arabinose..... —	0	0	0	0	0	0
Glucose..... —	0	0	0	0	0	0
Saccharose..... —	0	0	0	0	0	0
Lactose..... —	0	0	+	+	+	+
Alcool à 95°.. (0 cc. 2 %)	0	0	0	0	?	?
Mannite..... (2,5 %)	+	+	+	+	+	+
Acétate de sodium —	0	0	0	0	0	0
Citrate de sodium —	0	?	+	+	+	+

S. essayana.

RÉSULTATS DES EXPÉRIENCES N° 1.

Source d'Azote = Asparagine.

Source de Carbone = Asparagine + un des corps ci-dessous.

<i>Apparition du pigment</i>	Après 48 heures.	Après 3 jours.	Après 4 jours.	Après 6 jours.	Après 8 jours.	Après 10 jours.
Amidon..... (2,5 %)	0	?	?	?	?	?
Arabinose..... —	0	0	0	0	?	?
Xylose..... —	0	?	0	0	0	0
Glucose..... —	0	0	0	0	0	0
Lévulose..... —	0	0	0	0	0	0
Galactose..... —	0	0	0	0	0	0
Saccharose..... —	0	0	0	?	?	?
Lactose..... —	0	0	0	0	0	0
Maltose..... —	0	0	0	?	+	+
Alcool à 95°.. (0 cc. 2 %)	0	0	0	0	0	0
Mannite..... (2,5 %)	0	0	0	?	?	?
Acétate de sodium —	0	0	0	0	0	0
Citrate de sodium —	0	?	+	+	+	+

RÉSULTATS DES EXPÉRIENCES N° 2.

Source d'Azote = Sulfate d'Ammoniaque.

Source de Carbone = un des corps ci-dessous.

<i>Apparition du pigment</i> {	Après 48 heures.	Après 3 jours.	Après 4 jours.	Après 6 jours.	Après 8 jours.	Après 10 jours.
Amidon..... (2.5 %)	O	O	O	O	O	O
Arabinose..... —	O	O	O	O	O	O
Glucose..... —	O	O	O	O	O	O
Saccharose..... —	O	O	O	O	O	O
Lactose..... —	O	O	O	O	O	O
Alcool à 95°.. (0 cc. 2 %)	O	O	O	O	O	O
Mannite..... (2.5 %)	O	O	O	O	O	O
Acétate de sodium —	O	O	O	O	O	O
Citrate de sodium —	O	O	O	O	O	O

S. gutturis.

RÉSULTATS DES EXPÉRIENCES N° 1.

Source d'Azote = Asparagine.

Source de Carbone = Asparagine + un des corps ci-dessous.

<i>Apparition du pigment</i> {	Après 48 heures.	Après 3 jours.	Après 4 jours.	Après 6 jours.	Après 8 jours.	Après 10 jours.		
Amidon (2.5 %)	+	(faible)	+	(faible)	+	(faible)		
Arabinose —	O	O	O	O	O	O		
Xylose —	O	O	?	?	O	O		
Glucose —	O	O	?	?	?	+		
Lévulose —	O	+	(faible)	+	(faible)	+	(faible)	
Galactose —	O	O	O	?	?	+		
Saccharose —	+	(faible)	+	(faible)	?	?	?	
Lactose —	O	+	(faible)	?	O	O		
Maltose —	+	(faible)	+	(faible)	+	(faible)	+	(faible)
Alcool à 95° . . (0 cc. 2 %)	O	+	(faible)	+	(faible)	?	?	?
Mannite (2,5 %)	+	(faible)	+	(faible)	+	(faible)	+	(faible)
Acétate de sodium —	O	O	O	O	O	O		
Citrate de sodium —	+	(faible)	+	(faible)	+	(faible)	+	(faible)

RÉSULTATS DES EXPÉRIENCES N° 2.

Source d'Azote = Sulfate d'Ammoniaque.

Source de Carbone = un des corps ci-dessous.

<i>Apparition du pigment</i> {	Après 48 heures.	Après 3 jours.	Après 4 jours.	Après 6 jours.	Après 8 jours.	Après 10 jours.
Amidon..... (2,5 %)	0	?	?	0	0	0
Arabinose..... —	0	0	0	0	0	0
Glucose..... —	0	0	0	0	0	0
Saccharose..... —	0	0	0	0	0	0
Lactose..... —	0	0	0	0	0	0
Alcool à 95°.. (0 cc. 2 %)	0	0	0	0	0	0
Mannite..... (2,5 %)	0	0	0	0	0	0
Acétate de sodium —	0	0	0	0	0	0
Citrate de sodium —	0	?	+ (faible)	+ (faible)	+ (faible)	+ (faible)

S. stercoraria.

RÉSULTATS DES EXPÉRIENCES N° 1.

Source d'Azote = Asparagine.

Source de Carbone = Asparagine + un des corps ci-dessous.

<i>Apparition du pigment</i> {	Après 48 heures.	Après 3 jours.	Après 4 jours.	Après 6 jours.	Après 8 jours.	Après 10 jours.
Amidon..... (2,5 %)	+	+	+	+	+	+
Arabinose..... —	+	+	+	+	+	+
Xylose..... —	+	+	+	+	+	+
Glucose..... —	+	+	+	+	+	+
Lévnlose..... —	+	+	+	+	+	+
Galactose..... —	+	+	+	+	+	+
Saccharose..... —	+	+	+	+	+	+
Lactose..... —	+	+	+	+	+	+
Maltose..... —	+	+	+	+	+	+
Alcool à 95°.. (0 cc. 2 %)	0	0	0	0	0	0
Mannite..... (2,5 %)	+	+	+	+	+	+
Acétate de sodium —	0	0	0	0	0	0
Citrate de sodium —	+	+	+	+	+	+

RÉSULTATS DES EXPÉRIENCES N° 2.

Source d'Azote = Sulfate d'Ammoniaque.

Source de Carbone = un des corps ci-dessous.

<i>Apparition du pigment</i>	Après 48 heures.	Après 3 jours.	Après 4 jours.	Après 6 jours.	Après 8 jours.	Après 10 jours.
Amidon..... (2,5 %)	+	+	+	+	+	+
Arabinose..... —	0	0	0	0	0	0
Glucose..... —	0	0	0	0	0	0
Saccharose..... —	0	+	+	+	+	+
Lactose..... —	0	+	+	+	+	+
Alcool à 95°.. (0 cc. 2 %)	0	0	0	0	0	0
Mannite..... (2,5 %)	0	0	0	0	0	0
Acétate de sodium —	0	0	0	0	0	0
Citrate de sodium —	0	?	+	+	+	+

RÉSUMÉ.

1° Pour tous les germes, il y a lieu de signaler le rôle très favorable du *citrate de soude* et de la *mannite*, et le rôle absolument néfaste de l'*alcool éthylique* et surtout de l'*acétate de soude*.

2° Dans un milieu Lasseur de formule LI, tous les *glucides* peuvent se substituer à la glycérine et permettent la pigmentation de *S. marcescens* et de *S. stercoraria*.

3° Il en est de même pour *S. kiliensis* en exceptant toutefois *arabinose* et *galactose*.

4° Pour *S. essayana*, aucun glucide n'est meilleur que la glycérine.

5° Pour *S. gutturis*, *amidon*, *lévulose*, *maltose*, *mannite*, paraissent supérieurs à la glycérine, mais en réalité la pigmentation est faible et se limite à un liseré

à la partie supérieure, ou à un liquide rose pâle dont la teinte s'atténue souvent en peu de jours.

6° Dans un milieu dérivé de celui de Lasseur, mais où la source de carbone est strictement fournie par le corps étudié, on peut considérer comme les plus favorables à la chromogénèse :

<i>S. marcescens</i>	Citrate de soude. Mannite.
<i>S. kiliensis</i>	Citrate de soude. Mannite. Lactose.
<i>S. essayana</i>	Aucun corps carboné.
<i>S. gutturis</i>	Citrate de soude.
<i>S. stercoraria</i>	Citrate de soude. Lactose. Saccharose. Mannite.

CHAPITRE III

Discussion des expériences relatives à la chromogénèse.

Bien que des travaux antérieurs aient apporté une solution en apparence définitive à l'explication du phénomène de chromogénèse, nous avons observé certains faits qui nous ont paru ne pas cadrer entièrement avec ce qui était admis jusqu'ici.

On sait que le plus grand intérêt a été accordé au *Fer* et à la *Glycérine*, le premier considéré comme vecteur d'oxygène devant assurer la pigmentation; le second, favorisant l'hypertonie des milieux.

En somme, on a recherché toutes les causes de la pigmentation en fonction de la composition du milieu.

Mais, en s'en tenant à ces seules expériences, comment interpréter ce qui s'est passé au cours des nôtres?

N'avons-nous pas obtenu, en effet, des races achromogènes sur tous milieux et, mieux encore, une certaine espèce, *Serratia gulturis*, qui, chromogène sur gélose et sérum de bœuf, n'a jamais pigmenté sur milieu Lasseur Li?

Si la pigmentation dépendait réellement d'un vecteur d'oxygène et d'un milieu hypertonique, toutes les conditions eussent été réalisées dans nos essais.

Il y a donc d'autres inconnues dans cette question et il y a peut être lieu de faire quelques restrictions sur les explications données antérieurement.

On peut démontrer qu'il existe un lien entre la chromogénèse et la composition du milieu et que le choix des ions en est un facteur déterminant, mais cela n'est vrai qu'en partie.

Comment, en effet, interpréter, d'une part, la carence de *S. essayana* et surtout de *S. gutturis*, vis-à-vis du milieu Lasseur L₁; d'autre part, la réduction du pigment en blanc ou jaune sale, chez certaines cultures de *S. gutturis*, *S. stercoraria*, sinon en admettant :

1° Que le métabolisme de ces germes sur milieux liquides est totalement différent de ce qu'il est sur milieux solides.

2° Que, dans un même milieu, les phénomènes d'oxydo-réduction qui règlent le mécanisme de la respiration suivent des directions toutes différentes.

A quoi attribuer ces divergences sinon au microbe lui-même? A cet égard, nous nous permettons de citer un passage d'une conférence faite par R. Kuhn [74] au Congrès du Palais de la Découverte (octobre 1937).

Après avoir montré le rôle de certains éléments nutritifs déterminés (Fe, Cu, Zn, Co, Bo) sur les substances auxiliaires catalytiques de la cellule, l'auteur ajoute :

« Pour une substance active déterminée, cette réponse est souvent équivoque et dépend aussi de la nature de l'organisme considéré. Le fait que le travail synthétique de la cellule est fonction de l'être vivant auquel elle appartient est une des acquisitions les plus remarquables de la biochimie moderne..... Ainsi, voyons-nous combien différents sont les besoins qu'ont à satisfaire les substances nutritives, non seulement quand on

passé d'une cellule à une autre, mais aussi quand une cellule déterminée est soumise à différentes conditions extérieures. »

Hypothèse.

On suppose que chez les *Prodigiosus* la prodigiosine serait due à l'oxydation d'une substance-mère, la *leuco-prodigiosine*, sous l'influence d'une aéroxydase-ferment.

On pourrait donc supposer que chez *S. essayana* et *S. gutturis* qui pigmentent mal, ou ne pigmentent pas du tout sur milieu Lasseur L₁ de pH = 5,8, cette aéroxydase ne serait pas sécrétée, mais rien ne nous permet de l'affirmer.

Nous pensons plutôt qu'à côté de cette aéroxydase existe un autre ferment, sorte d'antidote du premier : une *déshydrogénase*.

Ne l'avons-nous pas mise nettement en évidence avec les milieux sans fer au molybdate?

Cette *déshydrogénase* très puissante serait capable, soit d'exercer son action sur la substance-mère de la matière colorante, comme elle l'exerce sur les autres accepteurs d'hydrogène, soit de neutraliser l'aéroxydase.

On nous objectera que nous avons démontré qu'en présence de fer cette *déshydrogénase* ne se formait pas. Rien n'autorise à aller aussi loin.

Si, dans les milieux Lasseur au fer, additionnés de molybdate, son action est nulle, c'est que le fer transporteur d'oxygène vient la neutraliser; alors, aucun phénomène ne se produit : pas de réduction des

molybdates d'une part, et pas d'oxydation de la substance-mère du pigment, d'autre part.

La chose est un peu différente chez *S. marcescens* et *S. kiliensis*.

Dès le début des cultures, l'*aéroxydase* accomplit son œuvre. Même sur un milieu Lasseur sans fer additionné de molybdate, nous avons le processus suivant : culture, pigmentation, et très légère teinte bleue du liquide.

Il n'y a pas d'obstacle au pigment (donc au rôle de l'*aéroxydase*), parce que la *déshydrogénase* sécrétée est insuffisante, tardive, et sans doute incapable de réduire un pigment bien formé et bien stable comme celui de *S. marcescens* et *S. kiliensis*.

Contre-expérience.

Si notre hypothèse : « *La sécrétion abondante d'une déshydrogénase dans certains milieux de culture vient empêcher le rôle de l'aéroxydase* » est exacte, on doit en avoir la preuve avec les races complètement *achromogènes*.

C'est ce que nos expériences ont vérifié.

Nous avons vu que *S. marcescens* et *S. kiliensis*, races chromogènes, réduisent très peu le molybdate ajouté au milieu Lasseur sans fer, et que cette faible réduction est le plus souvent postérieure à l'apparition du pigment qui a lieu quand même à la surface du milieu.

Avec des races *achromogènes* de *S. marcescens* et *S. kiliensis*, il en est tout autrement.

Ces germes réduisent le milieu indiqué ci-dessus, avec

une intensité égale à celle de *S. gutturis*, et ne produisent pas de pigment.

Nous sommes donc en droit de tirer les conclusions suivantes :

1° Les races achromogènes sécrètent plus de déshydrogénase que la variété chromogène d'un même germe.

2° Certains germes comme *S. gutturis* et *S. essayana*, bons chromogènes sur milieux solides, sécrètent (à la différence de *S. marcescens* et *S. kiliensis*) une déshydrogénase sur milieu Lasseur LI.

3° Il y a probablement une relation assez étroite entre la présence abondante de ce ferment dans la culture et la difficulté de pigmentation.

Nous voulons bien admettre la fragilité d'une telle hypothèse. Elle cadre cependant avec les théories modernes sur la respiration cellulaire.

La respiration *aérobie stricte* (Keilin [65-66]) exige le concours à la fois d'une activation de la matière organique qui s'oxyde par déshydrogénation et d'une activation de l'oxygène moléculaire qui devient capable de ce fait de servir d'accepteur d'hydrogène.

Des explications complémentaires pourraient d'ailleurs s'ajouter à nos expériences, en s'inspirant des techniques nouvelles d'études des bactéries non proliférantes, décrites par D. Bach [7].

En effet, dans nos cas d'aérobiose, peut-être l'oxygène n'est-il pas activé également par les cinq *Serratia*? Ou bien, la déshydrase sécrétée n'est-elle pas accompagnée d'une quantité suffisante de co-ferment pour tous les cas?

Ou bien, l'oxydation du substrat par déshydrogénation n'est-elle pas poussée à un stade aussi avancé par tous les germes?

Quoi qu'il en soit, toutes nos expériences ont montré une relation étroite entre le pouvoir réducteur des germes et leur difficulté de pigmentation sur milieu Lasseur L1.

Autres expériences.

I. — Attribuant le mécanisme de la pigmentation à une élaboration spéciale du microbe, nous avons voulu voir comment se comportait cette *aéroxydase* en vie anaérobie.

C'est un fait bien connu que les germes chromogènes perdent cette propriété en anaérobiose.

Nous l'avons vérifié avec des milieux un peu différents de celui de Lasseur et qui nous ont paru plus aptes à la vie anaérobie.

Nous avons utilisé à pH=5,8-5,9 :

des eaux peptonées,

des bouillons,

des formules Lasseur avec fer,

où la glycérine était remplacée par un des trois sucres : *xylose*, *glucose*, *saccharose*. L'anaérobiose était réalisée par un bouchon de lanoline.

Toujours, nous avons obtenu des cultures achromogènes.

Nous sommes donc fondé à affirmer qu'en *anaérobiose*, même en présence des meilleurs catalyseurs, vecteurs

d'oxygène ou non, la pigmentation ne peut avoir lieu, par suite de l'absence de l'oxygène de l'air.

II. - Les « *Prodigiosus* » sont des *anaérobies facultatifs*. Ce sont aussi, nous l'avons vu, des *dénitrifiants*.

Or, à l'heure actuelle, on est d'accord pour considérer la dénitrification comme une respiration aux dépens de l'oxygène du nitrate, qui joue le même rôle d'accepteur d'hydrogène que l'oxygène moléculaire dans la vie aérobie. Et les dénitrifiants, qui sont des anaérobies facultatifs, ont justement ce pouvoir d'activer indifféremment l'oxygène ou le nitrate; disons mieux : l'oxygène de l'air ou l'oxygène combiné.

Il pouvait donc être intéressant de voir comment se comportaient les cinq germes pour la pigmentation en *anaérobiose en présence de NO^3K* .

Nous avons effectué les cultures :

1° Sur milieu Lasseur (sans glycérine), avec :

Xylose + NO^3K + Fer (Bouchon de lanoline).

Glucose + NO^3K + Fer (").

Saccharose + NO^3K + Fer (").

2° Sur ces mêmes milieux sans fer.

Dans aucun cas, les germes, qui ont poussé, n'ont donné la moindre pigmentation.

Nous tirons donc cette conclusion :

1° C'est que l'O combiné n'a pas les mêmes propriétés que l'O moléculaire dans la chromogénèse.

2° Que les ions favorables à la chromogénèse en aérobie n'exercent plus leur rôle catalytique en présence d'oxygène combiné.

La *contre-expérience* est d'ailleurs facile à faire.

Si, au bout de 4 à 5 jours, on trouble par un agitateur le bouchon de lanoline qui réalise l'anaérobiose, on voit la pigmentation se dessiner peu à peu sur tout l'orifice de fracture.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Le hasard d'un examen de mucus pharyngé, sur sérum de bœuf coagulé, nous a permis d'isoler un germe pigmentant abondamment en rouge, pathogène pour le Lapin, le Cobaye, la Souris, et qui nous a fourni des résultats intéressants pour l'étude de quelques phénomènes de la vie bactérienne.

A titre de comparaison, M. le professeur Lutz qui avait isolé, un peu plus tard, une bactérie rouge d'un fumier de champignoniste, nous l'envoyait à étudier.

Les deux germes appartiennent au genre *Serratia* et se rapprochent des trois espèces étudiées par Combe : *S. marcescens*, *S. kiliensis*, *S. essayana*; mais, en raison de nombreux caractères morphologiques, biologiques et sérologiques bien distincts, nous nous sommes cru autorisé à les considérer comme des espèces nouvelles.

Nous avons appelé notre microbe : *Serratia gutturis* A. Jan (1933) et celui de M. Lutz : *Serratia stercoraria* A. Jan (1936).

Au cours de cette étude, nous avons signalé le développement différent des cultures en eau peptonée (*évolution vers l'alcalinité*) et en milieu Lasseur L₁ (*évolution vers l'acidité*).

En milieu nitraté, les processus sont également différents suivant que l'on cultive en eau peptonée nitratée ou en milieu Lasseur L₁, nitraté. Dans le premier cas,

S. essayana, *S. gutturis*, *S. stercoraria* dégagent des gaz ; ce caractère fait défaut dans le second. *S. marcescens*, *S. kiliensis* ne dégagent de gaz sur aucun milieu.

Nous considérons le *pouvoir réducteur* comme un bon élément de diagnose chez les bactéries du genre *Serratia*.

A côté de la réduction des protéines, des nitrates, des matières colorantes, *la transformation du molybdate d'ammonium en sous-oxyde de molybdène* nous a paru un fait extrêmement intéressant et d'appréciation facile de l'intensité de ce pouvoir réducteur.

On pourrait peut-être chercher à le mesurer exactement, soit par méthode colorimétrique, soit par méthode chimique, ce qui permettrait d'attribuer une valeur numérique au phénomène.

N'intervenant pas dans le métabolisme de la bactérie, le *molybdate* fonctionne uniquement comme accepteur d'hydrogène, et laisse supposer la présence, dans le milieu de culture, d'une *déshydrogénase très puissante*, plus ou moins abondante suivant nos cinq espèces.

L'étude des antiseptiques fait ressortir des actions très diverses, caractérisées surtout par des allongements et des gonflements des germes et qui permettent de différencier des espèces très voisines.

L'étude du pouvoir pathogène a montré que la virulence de *Serratia gutturis* et de *Serratia stercoraria* était due à leur *endotoxine* que l'on peut extraire des cultures jeunes par les nouvelles méthodes de Boisvin et Mesrobianu [27]. Les cultures sur bouillon, un peu âgées, contiennent en outre une *exotoxine* qui vient accroître le

pouvoir pathogène du microbe. Son maximum d'action a lieu entre le 8^e et le 23^e jour de culture.

Enfin, nous résumons les caractères différentiels de nos germes, comparés à ceux de Combe, dans un tableau synoptique qui peut servir de diagnose.

Dans la SECONDE PARTIE, nous avons jeté un coup d'œil rétrospectif sur les travaux concernant la chromogénèse et nous avons constaté que l'unité de vues, sur le mécanisme du phénomène, n'existait pas encore.

Après avoir essayé l'addition de plusieurs ions au milieu Lasseur et les avoir comparés au *Fer*, nous avons considéré que les conclusions antérieures relatives à ce métal concernent surtout des races très chromogènes sur milieu Lasseur LI, comme *S. marcescens* et *S. kiliensis*.

Une espèce moins chromogène, comme *S. gutturis*, n'est nullement influencée par la présence de fer en milieu Lasseur LI.

Les autres ions : Zn-Cu-Mn-Ni-Co-Cr, tout en étant inférieurs au fer, ne sont pas indifférents à la pigmentation et leur addition au milieu Lasseur rend celui-ci supérieur au milieu sans fer.

Cd a une action empêchante pour ce phénomène.

L'essai de différentes sources d'aliment carboné nous a amené à considérer le *citrate de soude* et la *mannite*, comme équivalents à la glycérine dans la pigmentation. *L'alcool éthylique* et *l'acétate de soude* semblent tout à fait néfastes. La plupart du temps même, *l'acétate de soude*, utilisé comme les autres corps à la dose de 10 %, semble absolument *antigénétique*.

Finalement, diverses expériences nous ont permis d'émettre sur la chromogénèse les hypothèses suivantes :

1° Le mécanisme du phénomène n'est pas dû uniquement à la composition du milieu. D'autres facteurs, probablement de nature diastasique et qui sont le *propre du germe*, doivent être recherchés.

Pour les espèces *S. essayana* et *S. gutturis*, qui pigmentent mal ou ne pigmentent pas sur milieu Lasseur, on peut supposer qu'il y a une relation assez étroite entre leur faculté de sécréter une déshydrogénase et leur difficulté de pigmentation.

Cette déshydrogénase viendrait contrebalancer les effets de l'aéroxydase et le résultat final serait nul.

En partant des souches achromogènes de *S. marcescens*, et *S. kiliensis*, on obtient la preuve que le rôle des déshydrogénases est à considérer dans la pigmentation.

Ces souches achromogènes réduisent en effet plus facilement les molybdates que les souches correspondantes de bonne pigmentation.

Cette hypothèse ne résout pas tout le problème de la chromogénèse. Elle n'a de valeur que pour le milieu liquide étudié (milieu Lasseur de pH = 5,8) et ne se s'applique pas aux milieux solides (gélose, sérum de bœuf) où la pigmentation est généralement bonne. Elle tient compte uniquement des phénomènes d'oxydo-réduction qui sont la conséquence directe du métabolisme et de la respiration propres à chaque bactérie.

2° D'autres expériences ont montré que le pigment (même des meilleurs chromogènes) ne se produisait qu'en présence de l'oxygène de l'air, quel que soit le milieu essayé et que le fer ne pouvait exercer son action catalytique qu'en sa présence également.

Bien qu'on ait considéré la respiration en vie anaérobie comme une respiration aux dépens de l'oxygène du nitrate, et qu'on ait remarqué chez les anaérobies facultatifs des phénomènes équivalents à ceux de la vie aérobie, si la chose est exacte pour de nombreuses fonctions de la cellule microbienne, il faut reconnaître que la fonction chromogène des bactéries du groupe « *Prodigiosus* » n'obéit pas à la même règle.

Ce phénomène exige absolument *l'oxygène de l'air*, et, *l'oxygène du nitrate* n'ayant pas les mêmes propriétés, ne saurait ici le remplacer, tout au moins dans les conditions où nous avons opéré, et qui sont cependant des conditions ayant assuré le développement normal des germes.

VU :

Le Président de la Thèse,

L. LUTZ

VU :

Le Doyen de la Faculté,

A. DAMIENS

VU et permis d'imprimer :

Le Recteur de l'Académie de Paris,

G. ROUSSY

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

1. ADAMETZ. — Bakteriologische Untersuchungen über den Reifungsprozess der Käse. *Landwirts. Jahrb.*, t. XVIII, p. 242, 1889.
2. AGULHON (H.). — Présence et utilité du Bore chez les végétaux. *Ann. Inst. Past.*, p. 321-329, 1910.
3. AGULHON (H.) et SAZERAC. — Action des sels de l'Uranium et de l'Uranium métallique sur le Bacille pyocyanique. *C. R. Acad. Sc.*, t. CLVI, p. 162-164, janv. 1913.
4. AÏTOFF (M.), DION (M.) et DOBKEVITCH (H.). — *Bac. prodigiosus* pathogène pour les animaux. Endotoxine et Réaction de Schwartzmann. *C. R. Soc. Biol.*, t. CXXIII, n° 28, p. 375, 1936.
5. AMAKO (T. H.). — Beiträge zur Kenntniss der Farbstoffbildung des *Bac. prodigiosus*. *Centralbl. f. Bakter.*, II, t. CXVI, p. 494-499, 1930.
6. BACH (D.). — La dénitrification suivant les vues modernes. *Bull. Sc. Pharm.*, t. XLII, n° 3 et 4, p. 170 et p. 230, 1935.
7. BACH (D.). — Sur une modification aux méthodes de Thunberg-Quastel, et de Braun et Wörderhoff pour l'étude des Réactions de déshydro-

généation par les Bactéries lavées. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, t. XIX, p. 87, 1937.

8. BACH (D.). — Sur le complexe respiratoire des graines au repos. Déshydrogénase et Co-ferment chez le *Pisum sativum*. *C. R. Soc. Biol.*, t. CXXVII, n° 3, 1938.
9. BACH (D.). — Sur le complexe respiratoire des graines au repos. Répartition de la déshydrogénase de l'ester hexose-diphosphorique chez quelques Légumineuses. *C. R. Soc. Biol.*, t. CXXVIII, n° 15, 1938.
10. BARRITT (N. W.). — The liberation of elementary Nitrogen by bacteria. *Bioch. Journ.*, t. II, n° 25, p. 1965, 1931.
11. BAVENDAMM. — Cité par A. Dupaix, dans *Thèse Doct. Pharmacie*, Nancy. « *B. caryocyaneus*, Beijerinck-Dupaix », p. 138, 1933.
12. BÉGUET (M.). — Sur les conditions de l'apparition du pigment dans les cultures de *Bac. prodigiosus*. *C. R. Soc. Biol.*, t. XCVIII, p. 937-939, 1928.
13. BEIJERINCK (M. W.). — *Folia mikrobiologica*, Delft., 1 Jhrg., p. 1-97, 1912.
14. BEIJERINCK (M. W.). — Variabilité chez *B. prodigiosus*. *Koninkl. Acad. Weetensk.*, 1912.
15. BEIJERINCK (M. W.). — *Arch. Néerland. de Physiol. de l'homme et des animaux*, t. II, p. 609-615, 1918.

16. BERTARELLI. — Untersuchungen und Beobachtungen über die Biologie und Pathogenität des *Bac. prodigiosus*. *Centralbl. f. Bakt.* I, t. XXXIV, p. 193-202. 1903.
17. BERTARELLI. — Ueber den *Prodigiosus* und die Theorien von der natürlichen Immunität. *Centralbl. f. Bakt.* I, Abt. XXXVII, Bd., p. 617-626, 1904.
18. BERTRAND (G.). — Sur le rôle capital du manganèse dans la formation des conidies de l'*Aspergillus niger* *C. R. Acad. Sc.*, t. CLIV, p. 381, 1912.
- 18^{bis}. BERGEY (D. H.). — Manual of determinative Bacteriology, 4^e édit., *Williams et Wilkings Company Baltimore*, 1934.
19. BESSON (A.). — Contribution à l'étude du *Vibrion septique*. *Ann. Inst. Past.*, t. IX, p. 176-198, 1895.
20. BIGWOOD (E. J.). — Le mécanisme de la respiration cellulaire en aérobiose et en anaérobiose. *Masson, édit., Paris*, 1935.
21. BIZIO (B.). — Première publication non signée de l'auteur : Travata della precisa cagione, che il produce il fenomena del superficiale coloramento in rosso della polenta. *Gazeta privilegia di Venezia*, n° 910-3-4, 1819. *Ref. in Breed* (R. S. et M. E.), 1924.
22. BIZIO (B.). — Lettera di Bartolomeo Bizio al chiarissimo canonico Angelo Bellani sopra il

- fenomeno della polenta porporino. *Biblioteca Italiana o sia Giornale di Letteratura, Scienze e Arti*. Appendice, t. XXX, anno 8, p. 275-295. 1823, *Réſ. In Breed* (R. S. et M. E.), 1924.
23. Bizio (B.). — Del fenomeno della polenta porporino. *Opusculi chimicofisici*, t. I, parte 2. Recherche e spiegazioni di alcuni fenomeni. Articolo I, p. 261-298. Giuseppe Antonelli, Venezia, 1827.
24. Bizio (B.). — Sur une altération du pain causée par le développement d'un cryptogame. Observation faite il y a très longtemps d'un phénomène qui rentre dans la classe de ceux sur lesquels Möser a appelé l'attention. *C. R. Acad. Sc.*, t. XVIII, p. 951-954, 1844.
25. BLANCHARD (D.). — Contribution à l'étude de la multiplication et des formes d'involution des *Cocci* pyogènes. *Thèse Doct. Pharm.*, Paris, 1936.
26. BOHN (G.). — L'évolution du pigment. *Scientia*, Biologie, n° 11, 1901.
27. BOISVIN (A.) et MESROBEANU (L.). — Recherches sur les antigènes somatiques et sur les endotoxines. *Revue d'Immunologie*, t. I, n° 6, p. 553 à 570, nov. 1935 ; t. II, n° 2, p. 113 à 144, mars 1936.
28. BORTELS (H.). — Ueber die Bedeutung von Eisen, Zinck und Kupfer für Mikroorganismen. *Biochem. Zeitschr.*, Bd. 182, 5/6, p. 301-358, 1927.

29. BRAUN (H.) et WÖRDERHOFF (Ph.). — Ueber die oxydativen und reduzierenden Fermentwirkungen des Ruhrbazillus Flexner. *Centralbl. f. Bakt.*, I, Abt. 128, p. 50, 1933.
30. BREUNIG (J.). — Bakteriologische Untersuchung des Trinkwassers der Stadt. Kiel. *Inaug. Diss.*, Kiel, 1888.
31. BRUYNOGHE (G.). — L'agglutination des *B. prodigiosus*. *C. R. Soc. Biol.*, t. CXXI n° 9, p. 891, 1936.
32. CADO (Y.). — Recherches microbiologiques et biochimiques sur des Bactéries muqueuses. *Thèse Doct. Pharm.*, Paris, 1936.
33. CASAGRANDE (O.). — L'antigeno per la prova della fissazione del complemento nell' infezione vaccinica variolosa, Paris, 1921.
34. CATALIOTTI (F.). — Ricerche sul *B. pyocyaneus*. *Giorn. Batt. et Immun.*, t. XV, p. 161, agost 1935.
35. CLARK (P. F.) et RUEHL (W. H.). — Morphological changes during the growth of Bacteria. *Journ. of Bact.*, t. IV, p. 615, 1919.
36. COMBE (E.). — Etude comparative de trois Bactéries chromogènes à pigment rouge. *Thèse Doct. Pharm.*, Nancy, 1933.
37. CORDIER (M.), PÉJU (G.) et RAJAT (H.). — Cultures achromogènes de *M. prodigiosus* en présence de liquides à haute tension de vapeur. *C. R. Soc. Biologie*, t. II, p. 344, 1908.

38. CORDIER (M.), PÉJU (G.) et RAJAT (H.). —
1° Influence de la lumière blanche diffuse et de
ses diverses radiations sur la fonction chromo-
gène de *M. prodigiosus*. *C. R. Soc. Biologie*,
t. II, p. 376, 1908 ; 2° Cultures achromogènes
de *M. prodigiosus*, en présence de liquides à
haute tension de vapeur. *Ibid.*, t. II, p. 435,
1908.
39. COZZOLINO. — Etiologie du choléra infantile.
Presse médicale, 1896
40. DELANOË. — Deuxième note sur la biologie du
B. prodigiosus. *C. R. Soc. Biologie*, t. LX,
p. 728, 1906.
41. DHÉRE (Ch.). — Etude fluoroscopique de la
chlororaphine et de ses dérivés. *C. R. Soc.
Biologie*, t. CXV, p. 1461-1463, 1934.
42. DOWDESWELL. — Sur une nouvelle espèce de
microbe chromogène, le *Bacterium rosaceus*
metalloides. *Ann. de microb.*, 1889.
43. DUBOIS SAINT-SÉVRIN. — Panaris des pêcheurs et
microbe rouge de la sardine. *Ann. Inst. Past.*,
t. VIII, p. 152, 1894.
44. DUCLAUX (E.). — Traité de Microbiologie. Masson
et C^{ie}, édit., Paris, 1898.
45. DUPAIX (A.). — *Bac. caryocyaneus*, Beijerinck-
Dupaix, 1930. Etude morphologique et biolo-
gique. Librairie Lefrançois, Paris, 1933.
46. EHRENBURG (C. G.). — Fortsetzung der Beobac-
tung des Sogennanten Blutes in Brode als

- Monas prodigiosa*. Acad. d. Wissenschaften, p. 354-362, 1849.
47. EHRENBURG (C. G.). — Fernere Mittheilungen über *Monas prodigiosa* oder die Purpurmonade, *Ibid.*, p. 101-116.
48. EISER et JACOBSON. — Ueber die antagonistische Wirkung steriler Bouillon extracte aus *Bact. prodigiosus*. *Zeitschr. f. Hyg.*, t. CXVII, p. 76, 1935. — *Anal. Bull. Inst. Past.*, t. XXXIV, p. 1126, 1936.
49. ENGELMANN (Th. W.). — Les Bactéries pourprées et leurs relations avec la lumière. *Arch. Néerlandaises*, t. XXIII, p. 151-198, 1888.
50. FREUND. — Ein Beitrag zur Kenntniss Chromogener Spaltpilze und ihrer Vorkommen in der Mundhöhle. *Inaug. Dissert.*, Erlangen, 1893.
51. FRIEDHEIM (E. A. H.). — 1° La fonction respiratoire du pigment du *B. violaceus*. *C. R. Soc. Biologie*, t. CX, p. 353-356, 1932 ; 2° Sur deux ferments respiratoires accessoires d'origine animale. *Id.*, t. CXI, p. 505-507, 1932.
52. GESSARD (M. C.). — Sur la fonction fluorescigène des microbes. *Ann. Inst. Past.*, t. VI, p. 801-823, 1892.
53. GLOBIG. — *Zeitschrift für Hygiene*, t. III, 1888.
54. GRIMBERT (L.). — 1° Action du *B. coli* et du *B. d'Eberth* sur les nitrates. *Ann. Inst. Past.*, t. XIII, p. 67, 1899 ; 2° Diagnostic des Bactéries

- par leurs fonctions biochimiques. *Thèse Doct. médecine*, Paris, 1903.
55. GROENEWEGE (J.). — *Bull. Jard. bot. Buitenzorg*, t. III, p. 261, 1931.
56. HEFFERAN (M.). — A comparative and experimental study of bacilli producing red pigment. *Centralbl. f. Bakt.*, II, Abt. XI, Bd., p. 311-317, 1904. *Ibid.*, p. 456-475.
57. HEFFERAN (M.). — Agglutination and biological relationship in the Prodigiosus group. *Centralbl. f. Bakt.*, II, t. XLI, Bd., p. 553-562, 1906.
58. HENRICI (A. T.). — Morphologic variations and the rate of growth of Bacteria, 1 volume, 1928, p. 194. Baillièrre, Tindall et Cox, London.
59. HERSHEY (A.) et BRONNFENBRENNER. — L'action de la composition du milieu sur le métabolisme de certaines bactéries d'origine intestinale fermentant lentement le lactose. *Journal of Bact.*, t. XXXII, p. 519-531, 1936.
60. JAROSLOW et PEKLO. — Die pflanzlichen Aktinomykosen. *Centralbl. f. Bakt.*, II. Bd. 27, p. 545, 1910.
61. JAVILLIER. — 1° Le zinc chez les plantes. *Ann. Inst. Past.*, t. XXII, p. 720, 1908 ; 2° Sur l'action de divers sels acides sur le développement de l'*Aspergillus niger*. *C. R. Acad. Sc.*, t. CLV, p. 193, 1912.
62. KAPLAN (M^{me}). — Influence du nombre des microbesensemencés sur la multiplication du

- B. pyocyane* dans un milieu de culture liquide. *Thèse Doct. Pharmacie*, Paris, 1931.
63. KHARASCH, CONWAY, BLOOM. — Some chemical factors influencing growth and pigments of microorgan. *Centralbl. f. Bakt.*, t. CXXV, p. 231, 1937.
64. KIEFERSTEIN (G.). — Ein neuer farbstoffbildender Micrococcus aus rother Milch. *Centralbl. für Bakt.*, I, t. XXI, p. 177, 1897.
65. KEILIN (D.). — On cytochrome, a respiratory pigment common to animals, yeast, and higher plants. *Proceedings Royal Society B.*, Londres, t. XCVIII, p. 312, 1925, 58 à 70.
66. KEILIN (D.). — Structure chimique et propriétés de quelques ferments (ou diastases) intracellulaires. *Actualités scientifiques et industrielles*, n° 724. *Congrès du palais de la Découverte*, Paris, 1937, t. VII. *Biologie*, 1^{re} partie, p. 357. Hermann et C^{ie}, éditeurs.
67. KERN. — Beitrag zur Kenntniss der Undarme und Magen der Vögel vorkommenden Bakterien. *Arb. aus der Bakt. Inst. der techn. Hochschule zu Karlsruhe*, I, p. 485, 1897.
68. KHOURI (A.). — Recherches sur l'influence de la lumière et de la composition du milieu de culture sur la fonction chromogène. *Thèse Doct. ès sciences*, Genève, 1937.
69. KOCH. — Untersuchungen über Bakterien. *Cohn's Beitrag zur Biol. der Pflanzen*, II, p. 399, 1897.

70. KÖGL (F.) et POSTOWSKY (J. J.). — 1° Ueber das grüne Stoffwechselprodukt des *B. chlororaphis*. *Liebig's Ann. d. Chemie*, Bd. 444, p. 1-7, 1925; 2° *Ibid.*, Bd. 480, Heft 2 et 3, p. 280-297. 1930.
71. KÖGL (F.) et TÖNNIS (B.). — Ueber Chlororaphin und Xantoraphin, ein Beitrag zur Chemie der Chinhydrone. *Liebig's Ann. d. Chemie*, Bd. 497, Heft 3, p. 265-289, 1932.
72. KRAFT (E.). — Beiträge zur Biologie des *Bacterium prodigiosum* und chemischen Verhalten seines Pigmentes. *Inaug. Diss. Apoth.*, Würzburg, 1902.
73. KUHN (R.). — Lactoflavin (Vitamin B₂). *Zeitschr. für angew. Chem.*, t. XLIX, p. 6-10, 1936.
74. KUHN (R.). — Relations chimiques entre vitamines et ferments. — *Réunion internationale de Physique, Chimie, Biologie*. — *Congrès du Palais de la Découverte*, Paris, octobre 1937, t. VII. Biologie. Hermann et C^{ie}, éditeurs.
75. KUNTZE (W.). — Weitere Bemerkungen zur Farbstoffbildung des *Prodigiosus*. *Centralbl. f. Bakt.*, II, Abt, XLIV, p. 299-309, 1907.
76. LASSEUR (Ph.). — Contribution à l'étude du *B. chlororaphis*. G. et S. *Thèse Doct. Sc. Nat.*, Nancy, 1911.
77. LASSEUR (Ph.). — 1° Contribution à l'étude du *B. Le Monnier*, nov. spec. *C. R. Soc. Biologie*, t. LXXIV, p. 47-48, 1913 ; 2° Influence du fer

sur la végétation et la coloration des cultures de diverses bactéries. *Ibid.*, p. 496-498.

78. LASSEUR (Ph.) et THIRY (G.). — Sur les cultures de Bactéries considérées jusqu'à présent comme achromogènes. *C. R. Acad. Sc.*, t. CLVI, p. 166-168, 1913.
79. LASSEUR (Ph.) et GIRARDET (F.). — Contribution à l'étude des pigments microbiens. *Bull. Soc. Sc. Nancy*, série IV, t. III, fasc. I, p. 1-77, 1926.
80. LASSEUR (Ph.), MARCHAL (J.) et DUPAIX (A.). — Modifications temporaires, modifications durables observées chez les Bactéries. *Trav. Lab. Microb. Nancy*. Fasc. III, p. 105-108, 1930.
81. LASSEUR (Ph.), DOMBRAY (P.) et DUPAIX (A.). — Relations entre les concentrations en ions H⁺ des milieux de culture, la végétation et la chromogénèse bactérienne. *Trav. Lab. Microb. Nancy*. Fasc. IV, p. 13-30, 1931.
82. LASSEUR (Ph.) et DUPAIX-LASSEUR (A.). — Cultures de quelques Bactéries chromogènes sur pomme de terre glycinée. *Trav. Lab. Microb. Nancy*. Fasc. VII, p. 45, 1934.
83. LAURENT. — Etudes sur la variabilité du *B. rouge de Kiel*. *Ann. Inst. Past.*, t. IV, p. 465-484, 1890.
84. LE DANTEC. — Etude de la morue rouge. *Ann. Inst. Past.*, t. V, p. 656, 1891.

85. LEDERER (E.). — Sur les caroténoïdes des Cryptogames. *Bull. Soc. Ch. Biol.*, t. XX, n° 5, p. 611, mai 1938.
86. LEPESME (P.). — Action de *B. prodigiosus* et *B. pyocyaneus* sur le Criquet Pèlerin. *C. R. Soc. Biol.*, t. CXXV, n° 19, p. 492, 1937.
87. LIBORIUS. — *Zeitschr. für Hygiene*, I, p. 115, 1886.
88. LIST. — Cité par Macé (E.). *Traité de Bactériologie*, p. 485.
89. LUSTIG. — Ein rother Bacillus in Flusswasser. *Centralbl. f. Bakt.*, t. VIII, p. 33, 1890.
90. MANOILOW (E.). — Ueber die Wirkung der Nickelsaze auf Microorganismen. *Centralbl. f. Bakt.*, II. Abt, Or. t. XVIII, 1907.
91. MARCHAL (J.). — Variation et mutation en Bactériologie. *Thèse Doct. Sc.*, Paris, 1932.
92. MARION (C.). — Contribution à l'étude du *B. aurantiacus tingitanus*. *Thèse Doct. Pharmacie*, Nancy, 1938.
93. MARX (H.). — Die Pathogenität des *B. prodigiosus*. Ein Bemerkung zur Farbstoffproduktion der Bakterien. *Arch. f. Klin. Chirurgie*. Bd. LXII, p. 347, 1900.
94. MASCHECK. — Bacteriologische Untersuchungen der Leitmeritzer Trinkwässer, 1887.
95. MASERO-ENRICO. — Il « *Bacillus prodigiosus* Flugge ». Nelle patologia del baco da setta a degli insetti. *Bol. Istit. sier. Milanese*, I, t. XIII,

- p. 52-56, 1934. *Anal. Bull. Inst. Past.*, t. XXXIII, p. 1120, 1935.
96. MINOUX (M.). — Considérations générales sur la forme des Bactéries. *Thèse Doct. Pharm.*, Nancy, 1927.
97. MONTAGNE (G.). — Coloration rouge des substances alimentaires par la présence du *Monas (Palmella mihi) prodigiosa* Ehren. *Bull. Soc. nat. et centr. d'Agric.*, Paris, II, p. 527-530, 1853.
98. PAPPENHEIM. — Coloration : méthode panoptique. *Diagnostics biologiques* de N. Fiessinger, 3^e édition, p. 148, 1929.
99. PARASCHIVESCO (Z.). — Sur l'antigène somatique « complet » renfermé dans le *Micrococcus prodigiosus*. *C. R. Soc. Biol.*, t. CXXI, n° 2, p. 175, 1936.
100. PASCAL (J.). — Action de quelques antiseptiques, et de la Lysocythine sur la morphologie et la cytologie du *Streptocoque*. *Thèse Doct. Pharmacie*, Paris, 1938.
101. PÉJU (G.) et RAJAT (H.). — Pigment normal du *M. prodigiosus* et teintes dégradées de ce pigment. *Bull. Soc. médic. Hôpit. Lyon*, t. VI, p. 150-151, 1907.
102. QUASTEL (J. H.) et WOOLDRIDGE (W. R.). — Some properties of the dehydrogenating enzymes of bacteria. *Biochemical Journal*, t. XXII, p. 689, 1928.

103. RAULIN (J.). — Etudes chimiques sur la végétation. *Thèse Sc. Phys.*, Paris, Masson, 1870. — Nouvelle édition de 1905 conforme à l'original, p. 169-189.
104. RÉGNIER (J.) et LAMBIN (S.). — Contribution à l'étude de la mesure des valeurs antimicrobiennes. *Bull. Acad. médéc.*, t. CV, p. 1-10, 1931.
105. RITTER (G.). — Zur physiologie des *B. prodigiosus*. *Centralbl. f. Bakt.*, II. Abt, VI. Bd., p. 206-209, 1900.
106. ROGER (G. H.). — Influence des produits du *B. prodigiosus* sur l'infection charbonneuse. *C. R. Soc. Biol.*, t. II, p. 375-376, 1895.
107. ROGER (G. H.). — De quelques causes qui modifient l'immunité naturelle. *C. R. Soc. Biol.*, t. I, p. 476-479, 1889.
- 107^{bis}. ROGER (G. H.). — Inoculation du charbon symptomatique au Lapin. *C. R. Soc. Biol.*, t. I, p. 77-78, 1889.
108. ROGER (G. H.). — Quelques effets des associations microbiennes. *C. R. Soc. Biol.*, t. I, p. 35-38, 1889.
109. ROLIN (M.). — La forme des Bactéries. Influence de quelques facteurs physico-chimiques sur leur morphologie. *Thèse Doct. Pharmacie*, Nancy, 1929.
110. ROSENBERG (W. W.). — Beiträge zur Kenntnis der Bakterienfarbstoffe insbesondere der Gruppe des *Bact. prodigiosum*. *Diss. Wurzburg*, 1899.

111. ROUGET. — Cité par Combe. *Thèse Doct. Pharmacie, Nancy*, p. 64, 1933.
112. SAMKOW (S.). — Zur physiologie des *B. prodigiosus*. *Centralbl. f. Bakter.*, II. Abt, Bd. XI, p. 305-311, 1903.
113. SANTORI (S.). — Erythro-Bacterium. In *Annali Igiene sperimentale*, VI, p. 159, 1896.
114. SCHEURLÉN. — Geschichtliche und experimentelle Studien über den *Prodigiosus*. *Arch. f. Hyg., München u. Leipzig*, t. XXVI, p. 1-31, 1896.
115. SCHRÖTTER (J.). — Ueber einige durch Bakterien gebildete Pigmente. *Beitr. z. Biol. d. Pflanzen*. Bd. I, Heft 2, p. 109-126, 1872.
116. SERTIC (V.). — Sur le rôle de la lysine B au cours de la bactériophagie. *C. R. Soc. Biol.*, t. CXXVI, p. 1074, 1937.
117. SHOTELLIUS (M.). — Biologische Untersuchungen über der *M. prodigiosus*. — *Festschrift a. v. Kölliker Gwidnet, Leipzig*, p. 185, 1887.
118. TEMPÉ. — Technique simple de culture en surface des microbes anaérobies. *C. R. Soc. Biologie*, t. CVII, p. 1021, 1931.
119. THÉVENIN (P.). — Contribution à l'étude des Bactéries chromogènes. *Thèse Doct. médecine, Toulouse*, 1897-1898.
120. THIRY (G.). — *Bacille polychrome et Actinomyces mordoré*. Recherches biologiques sur les Bactéries bleues et violettes. Polychromisme. Bailière, Paris, 1900.

121. TRIBONDEAU. — Coloration des cils microbiens ; méthode décrite dans *Diagnostics biologiques* de N. Fiessinger, 3^e édition, p. 42-45, 1929.
122. VAILLARD : cité par Combe. *Thèse Doct. Pharmacie*, Nancy, p. 64, 1933; cité par Dopter et Sacquépée, *Précis de Bactériologie*, p. 770.
123. VAN NIEL (C. B.) et MULLER (F. M.). — *Recueil des Trav. Bot. Néerl.*, t. XXVIII, p. 245-274, 1931.
124. VINCENT (H.). — Sur les aptitudes pathogènes des microbes saprophytes. *Ann. Inst. Past.*, t. XII, p. 785, 1898.
125. VÉLU (H.) et BALOZET (L.). — Production expérimentale d'un agent du rouge des salaisons par mutation brusque du *B. prodigiosus*. *C. R. Soc. Biol.*, t. I, p. 1095, 1929.
126. VUILLEMIN (P.). — Genera Schizomycetum. *Annales mycologici*, XI, n^o 6, p. 512-527, 1913.
127. WARBURG (O.). — Chemische Konstitution von Fermenten. *Réunion internationale de Physique, Chimie, Biologie. — Congrès du Palais de la Découverte*, octobre 1937, t. VII. Biologie, p. 345. Hermann et C^{ie}, éditeurs.
128. WASSERZUG (E.). — Variation de forme chez les Bactéries. *Ann. Inst. Past.*, t. II, p. 75-83, p. 154, 1888.
- 128^{bis}. WINOGRADSKY (S.). — Ueber Schwefelbacterien. *Bot. Zeitg.*, n^{os} 31-37, p. 34, du tiré à part, 1887.

129. WINSLOW (C. E. A.) et LOCKRIDGE (E.). — The toxic effect of certain acids upon colon and typhoid bacilli in relation to their degree of dissociation. *J. inf. dis.*, t. III, p. 547, 1906.
130. WREDE (F.) et HETTCHE (O.). — Ueber das prodigiosin, den roten Farbstoff des *Bacillus prodigiosus*. — *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft*. LXII, Heft. 9, p. 2678-2685, 1929.
131. ZIMMERMANN (D. E. R.). — Die Bakterien unserer Trink und Nützwässer. Carl Brunner, Chemnitz, t. I, p. 106, 1890. *Ibid.*, t. II, p. 92, 1894.
-

TABLE DES MATIERES

	PAGES
INTRODUCTION	9
PLAN DU TRAVAIL.....	12

PREMIERE PARTIE

CHAPITRE I

<i>Généralités sur les microbes à pigment rose ou rouge</i>	15
Microbes chromogènes très différents du nôtre...	15
Microbes chromogènes présentant quelques analogies avec le nôtre.....	16

CHAPITRE II

Origine des souches.....	19
Morphologie. -- Dimensions.....	19
1. — Caractères morphologiques sur milieux solides	20
2. — Caractères morphologiques sur milieux liquides	22
Mobilité	26
Coloration. — Vacuole. — Capsule.....	27

CHAPITRE III

<i>Aspect macroscopique des cultures sur milieux solides</i>	28
1. — Sur gélose.....	28
2. — Sur sérum de bœuf coagulé.....	28
3. — Sur pomme de terre.....	28

	PAGES
<i>Aspect macroscopique des cultures sur milieux liquides</i>	29
1. — Sur bouillon et eau peptonée.....	29
2. — Sur milieu Lasseur I.....	29
<i>Influence d'agents physico-chimiques extérieurs sur les cultures</i>	30
1. — Le pH	30
2. — La température	30
a) Croissance	30
b) Pigmentation	31
3. — L'oxygène	32
4. — La lumière.....	33
5. — Le temps.....	34

CHAPITRE IV

Le pigment	35
------------------	----

CHAPITRE V

<i>Etude du développement des cultures</i>	41
<i>Etude de quelques fonctions diastasiques</i>	43
1. — Action sur la gélatine.....	43
2. — Action sur le lait.....	43
3. — Action sur le sérum de bœuf coagulé...	44
4. — Action sur l'albumine d'œuf coagulée.....	44
5. — Action sur les peptones.....	44
<i>Fermentation des glucides</i>	45
<i>Pouvoir réducteur</i>	47
1. — Action sur le noyau soufré des protéines.	47
2. — Action sur les nitrates.....	48
3. — Action sur les molybdates.....	51
4. — Action sur les matières colorantes.....	53
5. — Action sur la matière colorante sécrétée dite : « <i>Prodigiosine</i> ».....	54

CHAPITRE VI

Résistance aux antiseptiques. Variations morphologiques provoquées par la présence d'antiseptiques	55
Résultats généraux des expériences.....	59

CHAPITRE VII

<i>Pouvoir pathogène</i>	66
Généralités	66
Expériences avec la souche <i>A. J.</i>	70
Expériences avec la souche <i>L. L.</i>	72
Observations sur la pathogénie des germes...	72
<i>Caractères sérologiques</i>	74

CHAPITRE VIII

Place des deux microbes dans la classification.....	77
---	----

SECONDE PARTIE

Contribution à l'étude du phénomène de chromogénèse.

CHAPITRE I

Généralités	80
La chromogénèse chez les « <i>Prodigiosus</i> ».....	84
Orientation des travaux modernes. — Les milieux synthétiques chez les « <i>Prodigiosus</i> » et autres germes chromogènes.....	89

CHAPITRE II

§ I. — <i>Influence des métaux catalyseurs</i>	97
1. — Résultats obtenus chez les « <i>Prodigiosus</i> » avec le milieu Las-seur I, dans les travaux anté-rieurs	99

	PAGES
2. — Résultats des expériences.....	99
a) Races chromogènes.....	100
b) Races achromogènes.....	104
3. — Résumé du paragraphe.....	106
§ II. — <i>Influence de différentes sources d'aliment</i> <i>carboné</i>	108
Résumé du paragraphe.....	114

CHAPITRE III

Discussion des expériences relatives à la chromo- génèse	116
Hypothèse	118
Contre-expériences	119
Autres expériences.....	121
CONCLUSIONS GÉNÉRALES.....	124
INDEX BIBLIOGRAPHIQUE.....	129
TABLE DES MATIÈRES.....	147

IMP. OBERTHUR, RENNES—PARIS
(2761-39).
